

CONICET



C E F O B I

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos

Tesis de doctorado

“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-B EN PLANTAS”

Lic. Julieta Paola Fina

Directora: Dra. Paula Casati

Rosario

2017

Argentina

Estudio del efecto de la radiación UV-B en plantas

Julieta Fina

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Departamento de Química Biológica, Área de Química Biológica dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de febrero de 2012 y el 1 de noviembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Paula Casati.

Directora Dra. Paula Casati.....
Jurado
Jurado.....
Jurado.....
Defendida.....

Índice

ABREVIATURAS	7
ANGLICISMOS	9
AGRADECIMIENTOS	10
RESUMEN	11
1 Introducción.....	12
1.1 Percepción de la radiación UV-B y señalización	12
1.2 Efectos de la radiación UV-B en las plantas	16
1.2.1 Cambios en el desarrollo y arquitectura de las plantas	16
1.2.2 Respuestas de estrés inducidas por altas intensidades de UV-B	16
1.2.3 Efectos de la radiación UV-B en interacción con otras variables ambientales	21
1.2.4 Cambios en la expresión génica inducidos por UV-B	22
2 Capítulo 1: “Estudio del rol de enzimas que participan en la acetilación de histonas en las respuestas frente a la radiación UV-B en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>”	26
2.1 Introducción.....	27
2.1.1 Estructura de la cromatina	27
2.1.2 Rol de la acetilación de las histonas en la respuesta de las plantas a estímulos externos	34
2.2 Objetivos:	37
2.2.1 Objetivo general:.....	37
2.2.2 Objetivos particulares:	37
2.3 Materiales y métodos	38
2.3.1 Material vegetal - líneas utilizadas	38
2.3.2 Condiciones de cultivo	39
2.3.3 Tratamientos con UV-B	40
2.3.4 Purificación de ácidos nucleicos.....	40
2.3.5 Electroforesis en geles de agarosa	41
2.3.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	42
2.3.7 Tratamiento con ADNasa I y retrotranscripción.....	42
2.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42

2.3.9	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	43
2.3.10	Análisis del daño en el ADN.....	45
2.3.11	Densitometría de las imágenes	46
2.3.12	Cuantificación de flavonoides y antocianinas	46
2.3.13	Ensayo de elongación de la raíz primaria	46
2.3.14	Medidas del área de la roseta	47
2.3.15	Observación microscópica de las células del parénquima en empalizada	47
2.3.16	Determinación del tiempo de floración	47
2.3.17	Determinación de parámetros de daño oxidativo	48
2.3.18	Determinación de los niveles de ploidía a través de la técnica de citometría de flujo.....	49
2.3.19	Análisis estadístico	50
2.4	Resultados	51
2.4.1	Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia GNAT en las respuestas a la radiación UV-B.....	51
2.4.2	Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 en respuesta a la radiación UV-B	74
2.4.3	Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia TAF _{II} 250 en las respuestas a la radiación UV-B.....	92
3	“Estudio del crecimiento de la hoja de plantas de maíz expuestas al UV- B solar”	114
3.1	Introducción.....	115
3.1.1	Desarrollo de las hojas	115
3.1.2	Efecto de la radiación UV-B en el desarrollo de las hojas	124
3.2	Objetivos	125
3.2.1	Objetivo general:.....	125
3.2.2	Objetivos particulares:	125
3.3	Materiales y métodos	126
3.3.1	Material vegetal y condiciones de crecimiento	126
3.3.2	Análisis cinemático.....	126
3.3.3	Análisis de daño en el ADN utilizando la técnica de dot blot	129
3.3.4	Extracción de ARN.....	129
3.3.5	Experimentos de transcriptómica	129

3.3.6	Cuantificación de los niveles de las fitohormonas	130
3.4	Resultados	134
3.4.1	Efectos de la radiación UV-B en el crecimiento de la hoja de maíz	134
3.4.2	Análisis cinemático	137
3.4.3	Efecto de la radiación UV-B en el transcriptoma de la zona de crecimiento (GZ) de maíz	140
3.4.4	Cuantificación de los niveles de fitohormonas en la la hoja #4 de maíz de plantas control y expuestas al UV-B	152
3.4.5	Rol del factor de transcripción ZmGRF1 en la inhibición del crecimiento por la radiación UV-B	155
3.4.6	Discusión y Conclusiones	163
4	Conclusiones	152
5	Referencias bibliográficas.....	171

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se dieron a conocer en Publicaciones y Presentaciones en Congresos Científicos, como se detalla a continuación:

PUBLICACIONES

- Fina, J.P y Casati P. HAG3, a Histone Acetyltransferase, Affects UV-B Responses by Negatively Regulating the Expression of DNA Repair Enzymes and Sunscreen Content in Arabidopsis thaliana. (2015) Plant Cell Physiol. doi:10.1093/pcp/pcv054.

CONGRESOS CIENTÍFICOS

- 2013. Segunda reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos. “Estudio del rol de enzimas que participan en la acetilación de histonas en las respuestas frente a la radiación UV-B en plantas de Arabidopsis thaliana” Julieta Fina, Paula Casati (Presentación de poster).
- 2014. 6th International Congress on Photobiology. “UV-B Effects in Maize Leaf Development”. Julieta Fina, Romina Casadevall, Gerrit Beemster, Paula Casati (Comunicación oral).
- 2014. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. “Estudio del rol de enzimas histona acetiltransferasas de la familia HAG en las respuestas frente a la radiación UV-B en Arabidopsis thaliana”. Julieta Fina, Paula Casati (Presentación de poster).
- 2015. XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. “Estudio del rol de enzimas histona acetiltransferasas en las respuestas frente a la radiación UV-B en Arabidopsis thaliana”. Fiorella Masotti, Franco Crevacuore, Julieta Fina, Paula Casati. (Presentación de poster)
- 2015. 11th International Congress of Plant Molecular Biology. “UV-B radiation inhibits cell proliferation in maize leaves through transcriptional changes of cell cycle and developmental genes”. Julieta Fina, Romina Casadevall, Gerrit Beemster, Paula Casati (Presentación de poster).
- 2016. III Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos. “La radiación UV-B inhibe la proliferación celular en la hoja de maíz a través de cambios en los niveles de fitohormonas y en la expresión de los factores de transcripción GRF. Julieta Fina, Romina Casadevall, Gerrit Beemster, Paula Casati (Presentación de poster).

ABREVIATURAS

6-4 PPs Dímeros de pirimidina (6-4) pirimidona
ABA Ácido abscísico
ADN Ácido desoxirribonucleico
ADN-T Segmento de ADN del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*
ADNasa I Desoxirribonucleasa I
ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN Ácido ribonucleico
ARNasa Ribonucleasa
ARNi ARN interferencia
ARNm Ácido ribonucleico mensajero
ATP Adenosín trifosfato
BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
BER Reparación por escisión de bases (del inglés, Base Excision Repair)
Col0 Columbia 0
CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DEPC Dietilpirocarbonato
DEZ (del inglés, Dividing and Elongating Zone)
dNTPs Desoxirribonucleótidos
DPCs Dímeros de pirimidina por formación de un anillo de ciclobutano
DTT Ditiotreitól
EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
EROs Especies reactivas del oxígeno
EZ (del inglés, Elongation Zone)
FLC (del inglés, Flowering Locus C)
GA Giberelinas
GZ (del inglés, Growing Zone)
HATs histonas acetiltransferasas
HDACs histonas deacetilasas
IAA Ácido indolacético
JA Ácido jasmónico
miR396 microARN 396
MS Medio de cultivo Murashige and Skoog
MZ (del inglés, Mature Zone)
NBT Azul de nitrotetrazolio

NER Reparación por escisión de nucleótidos

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)

RT Reacción de retrotranscripción

SA Ácido salicílico

SDS Dodecil sulfato de sodio

TBA Ácido tiobarbitúrico

TBARS Sustancias reactivas al TBA

TBE Buffer Tris borato EDTA

TBS Buffer Tris salino

TCA Ácido tricloroacético

TE Buffer Tris EDTA

UV Ultravioleta

ANGLICISMOS

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

Dot blot: técnica que emplea la hibridización de ADN genómico desnaturalizado con hidróxido de sodio a una membrana apropiada, para un posterior revelado con anticuerpos específicos, los cuales detectan lesiones en el ADN.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

LC-MS: cromatografía líquida asociada a espectrometría de masa

ARN-seq: técnica de secuenciación de transcritos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Paula por darme la posibilidad de hacer el Doctorado en su laboratorio, por su ayuda, por permitirme crecer a mi manera...

A Lore por ayudarme muchísimo, por escucharme y por aconsejarme.

Al team Mardel 2012, Evi, Lau, Romi Casadevall y Julita porque sin su contención yo no hubiese terminado. Porque son excelentes personas y amigas!

A Solsi, a Sil, a Lu, a Romi R, a Valen, por acompañarme en este camino algo difícil para mí, por las charlas, por las juntadas, gracias!

A mis tesinistas por ayudarme a terminar mi trabajo de tesis, especialmente a Fiore por ser una gran compañera y amiga! Te quiero y estoy muy agradecida de que formes parte de mi vida!!

A la banda Nerd, porque a pesar de que el tiempo pasa y cada una esta en un lab distinto, nos seguimos juntando y no nos cansamos de charlar! Por acompañarme, por las risas, por los momentos vividos...

A toda la gente del CEFOBI, por la buena onda, por los almuerzos, por las risas.

A mis amigas de Venado, Chula, Vale, Koko, Yani, Clari, Meli, Elo, Negra, Mari, que siempre están ahí, para tomar un mate, una cervecita, una comida... ahora sí, por muchos momentos más como esos!

A Gabi, una amiga inseparable que estuvo y está siempre, que me pregunta todo, todo el tiempo, me hace sentir contenida y me da siempre fuerzas para seguir.

A mi mamá rosarina, tía sin vos esto no hubiera sido posible, infinitamente agradecida de todo lo que hiciste por mí, vales oro, te quiero y te voy a extrañar muchísimo! A mi hermanito rosarino, gracias Juanchi por las charlas, las pelis, porque a pesar que me decías que era pesada se que me vas a extrañar y yo mucho más!

A mis abus, porque siempre están pendientes de mis proyectos, de mis logros, porque cada año que pasaba me preguntaban si ya me volvía, por su compañía, los quiero a los que están y extraño a quien no está...

A mis papis, porque hacen de todo para que nos vaya bien, porque son nuestra guía y se desviven por nosotros; obviamente esto tampoco hubiese sido posible sin ustedes, son todo para mí... gracias, gracias, gracias!

A Bre, mi hermana, compañera, amiga... no me alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que hiciste y haces por mí, por aguantarme, por escucharme, por aconsejarme, por quererme loca así como soy y tenerme en cuenta para todos los planes de tu vida...

A Fer, por darme fuerzas para estar 10 años en Rosario, por escucharme tantas veces y ayudarme a superar y soportar todo. Por alegrarte conmigo por cada buena noticia, por ser parte de mi vida. Te amo mamior!

A todos gracias, los quiero y a los rosarinos los voy a extrañar!

RESUMEN

Capítulo 1

“Estudio del rol de enzimas que participan en la acetilación de histonas en las respuestas frente a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*”

Arabidopsis thaliana posee cuatro familias de histonas acetiltransferasas, la familia GNAT que posee 3 miembros denominados HAG1, HAG2 y HAG3; la familia MYST que posee 2 miembros, HAM1 y HAM2; la familia p300/CBP que posee 5 miembros denominados HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12; y la familia TAF_{II}250, que posee 2 miembros, HAF1 y HAF2. En este trabajo de Tesis, la utilización de plantas de *Arabidopsis thaliana* con niveles nulos o disminuidos de las histonas acetiltransferasas de las familias HAG, HAC y HAF nos permitió demostrar que las histonas acetiltransferasas HAG3, HAF1 y HAC1 tienen diferentes roles durante la exposición de las plantas a la radiación UV-B, debido a que regulan la expresión de genes de respuesta al UV-B que son necesarios para el desarrollo de las mismas en respuesta a esta radiación.

Capítulo 2

“Estudio del crecimiento de la hoja de plantas de maíz expuestas al UV-B solar”

En Argentina, la producción agropecuaria es uno de los ejes de la economía, siendo el maíz uno de los principales cultivos. En trabajos anteriores se demostró que la radiación UV-B inhibía el crecimiento de las hojas de maíz. En este trabajo de Tesis, demostramos que los niveles de radiación UV-B presentes en la radiación solar inhiben el crecimiento de las hojas de maíz como consecuencia de una disminución en la producción celular; y esta respuesta está mediada, en parte, por el factor de transcripción ZmGRF1.

1 Introducción

La radiación solar es esencial para la vida en la tierra. Las plantas superiores utilizan la luz solar para dirigir y regular procesos fundamentales como la germinación, el crecimiento y desarrollo, la fotosíntesis, el ritmo circadiano y la floración (Müller-Xing y col., 2014). Las componentes del espectro electromagnético que participan en estos procesos incluyen la luz visible y parte de la radiación ultravioleta (UV) e infrarroja. Basado en las longitudes de onda que abarca, la radiación UV se divide en tres regiones: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm). La radiación UV-C es extremadamente dañina, pero es efectivamente absorbida por el oxígeno, el ozono y el nitrógeno de la atmósfera, y por lo tanto, no llega a la superficie de la tierra. A diferencia de la radiación UV-C, la radiación UV-A alcanza la superficie terrestre casi en su totalidad y constituye una importante señal fotomorfogénica en las plantas. Por último, la radiación UV-B es absorbida en su gran mayoría en la estratósfera por la capa de ozono. Sin embargo, como consecuencia de la depleción de la capa de ozono estratosférica por el uso extensivo de compuestos clorofluorocarbonados y otras sustancias que destruyen al ozono, la superficie terrestre está siendo expuesta a niveles incrementados de la radiación solar UV-B (Jenkins, 2009; Aggarwal y col., 2013; Parihar y col., 2015).

1.1 Percepción de la radiación UV-B y señalización

Las respuestas inducidas por la radiación UV-B varían ampliamente dependiendo del tipo de tratamiento realizado, es decir, según la longitud de onda utilizada, la intensidad y la duración de la exposición (Jenkins, 2009). En general, dosis crónicas de baja intensidad promueven el desarrollo fotomorfogénico de las plantas, que está caracterizado por la inhibición del crecimiento del hipocótilo, la acumulación de flavonoides y por respuestas de adaptación (Jenkins, 2009). Estas respuestas están principalmente mediadas por el fotorreceptor UVR8 (Jenkins, 2014). Por otro lado, tratamientos con UV-B de alta intensidad inducen respuestas no específicas, fundamentalmente respuestas de estrés relacionadas con cambios fisiológicos, incluyendo el daño en el ADN, la generación de especies reactivas del oxígeno y la inhibición de la fotosíntesis (Jenkins, 2009; Besteiro y col., 2011).

UVR8 (del inglés “UV RESISTANCE LOCUS 8”) es un fotorreceptor de UV-B que actúa en la vía de señalización del UV-B. Plantas mutantes nulas en *UVR8* son hipersensibles a la radiación UV-B, mientras que plantas que sobreexpresan este gen mostraron respuestas fotomorfogénicas, aclimatación y tolerancia aumentadas frente a esta radiación (Favory y col., 2009). La proteína UVR8 se encuentra

distribuida uniformemente en el citoplasma y en el núcleo, y sus niveles no varían por la influencia del UV-B ni de otro tipo de calidad de luz. Sin embargo, UVR8 se redistribuye luego de la exposición con UV-B, acumulándose en el núcleo (Kaiserli y Jenkins, 2007). En el estado inactivo es un homodímero que se monomeriza rápidamente cuando es irradiado con UV-B. Los residuos del aminoácido aromático triptófano de cada una de las subunidades ubicados en la superficie donde interactúan ambos monómeros son claves en este proceso, actuando como cromóforos (Heijde y Ulm, 2013). El triptófano, por las características de su estructura, es capaz de absorber la radiación UV-B, siendo el Trp-285 esencial para la monomerización de UVR8 (Rizzini y col., 2011).

Sólo se han identificado algunos de los factores que actúan cuesta abajo en la cascada de señalización de UVR8 (Figura 1). En *Arabidopsis thaliana*, el fotorreceptor UVR8 interactúa de una manera UV-B-dependiente con la proteína E3 ubiquitina ligasa COP1 (del inglés “CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1”), que es un regulador central de la señalización de la luz visible y de la radiación UV-B. COP1 es un represor de la fotomorfogénesis, tanto en la oscuridad como en la luz, pero es un activador de respuestas específicas del UV-B. Esta proteína se acumula en el núcleo de una manera UVR8-dependiente en presencia de radiación UV-B. La interacción con UVR8 es un evento temprano en el mecanismo de señalización que favorece la aclimatación de las plantas para finalmente conferir tolerancia al UV-B (Favory y col., 2009). Ambas proteínas son requeridas para la activación de la expresión del gen *HY5*, el cuál actúa como un activador transcripcional de genes importantes para la respuesta al UV-B y tiene un rol vital en la protección contra esta radiación y en el mantenimiento de la fotosíntesis (Brown y col., 2005). Además de regularse transcripcionalmente, la proteína *HY5* se estabiliza en presencia de la radiación UV-B y, en ausencia de ésta se produce su ubiquitinación por COP1 y su posterior degradación en el proteasoma, lo que indica que parte del mecanismo de señalización por UV-B implica la inactivación de COP1 (Favory y col., 2009; Heijde y Ulm, 2013). Además, experimentos con plantas mutantes *hy5* y *hyh* (del inglés “HY5 homolog”) demostraron que los dos factores de transcripción median la respuesta al UV-B a través de la vía dependiente de UVR8, estimulando la expresión de distintos genes. Sin embargo, el rol de *HY5* sería más importante dado que plantas mutantes *hy5* mostraron ser hipersensibles a la radiación UV-B, al igual que plantas *uvr8*, mientras que plantas *hyh* mostraron ser más tolerantes a esta radiación en comparación a las mutantes *hy5* (Brown y Jenkins, 2007).

Por otro lado, las proteínas RUP1 y RUP2 son reguladores negativos en la vía de señalización mediada por UVR8, dado que plantas sobreexpresantes *RUP2* resultaron ser hipersensibles a la radiación UV-B, mientras que las dobles mutantes *rup1 rup2* mostraron mayor inducción de genes de respuesta al UV-B, tales como *CHS* y *HY5*; y consecuentemente mostraron mayor tolerancia a la radiación que las plantas salvajes (Gruber y col., 2010). Además, los genes *RUP1* y *RUP2* son inducidos por la radiación UV-B de una manera UVR8-COP1-HY5 dependiente, y ambas proteínas pueden interactuar con UVR8 (Gruber y col., 2010). Se ha postulado que el rol de las proteínas RUP1 y RUP2 sería el de unirse a UVR8 para romper la interacción con COP1 y permitir su consecuente dimerización (Heijde y Ulm, 2013). Por lo tanto, este mecanismo permitiría que UVR8 vuelva a su estado basal de dímero (Heijde y Ulm, 2013).

Por último, el factor de transcripción FHY3 (del inglés: “Far-red elongated hypocotyl”) fue previamente caracterizado como un componente de señalización del fitocromo A (Lin y col., 2007). Sin embargo, en el año 2012, Huang y col. reportaron que FHY3 y HY5 se unen a elementos regulatorios del promotor de COP1 para inducir su expresión en respuesta a la radiación UV-B. Además, mostraron que mutantes *fhy3* presentan menor tolerancia al UV-B, demostrando que FHY3 es un regulador positivo de la vía de señalización de UV-B.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, a altas dosis de radiación UV-B se producen respuestas no específicas, generalmente asociadas a estrés y que involucran otras vías, como la de la proteína ATR (del inglés “ATM AND RAD3-RELATED”) o la cascada de MAP quinasas regulada por MKP1 (del inglés “MAP KINASE PHOSPHATASE 1”) (González Besteiro y Ulm, 2013). La vía mediada por ATR ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, regula transiciones del ciclo celular, la transcripción de algunos genes que participan en la progresión del ciclo celular, la reparación del daño en el ADN y la apoptosis en condiciones que causan estrés replicativo, siendo el estrés por radiación UV-B una de ellas (Sancar y col., 2004; Culligan y col., 2004).

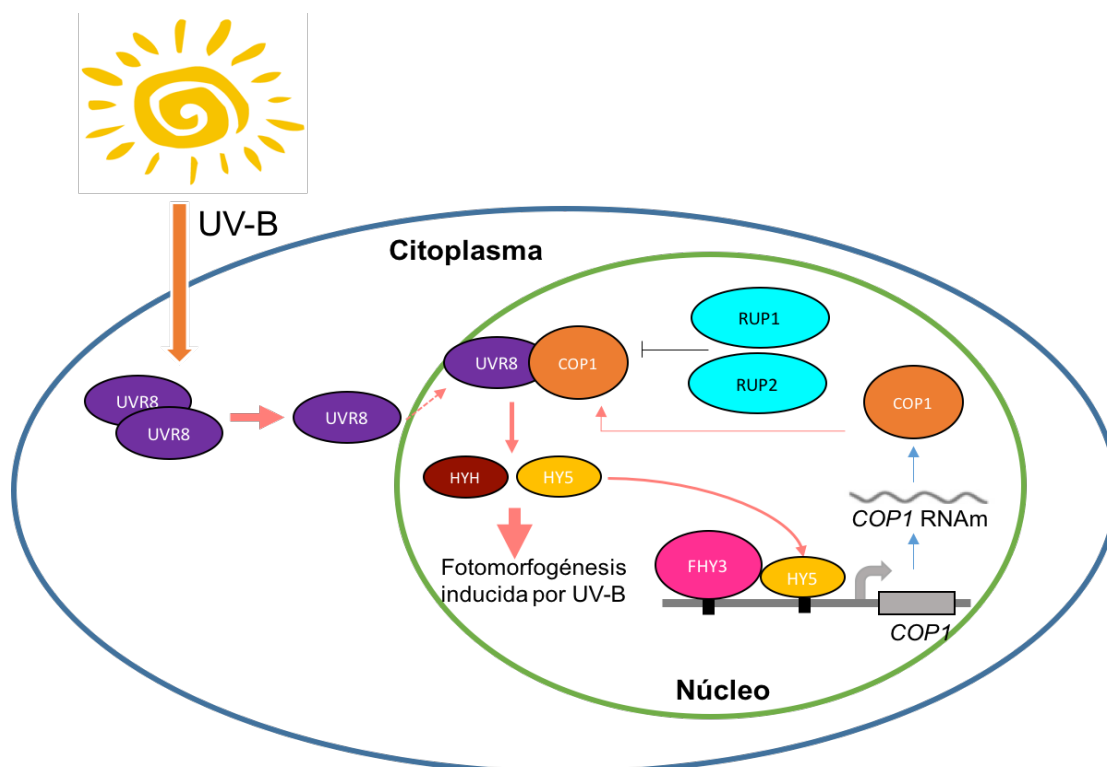


Figura 1. Modelo de la vía de señalización por UVR8. En presencia de radiación UV-B, UVR8 se monomeriza, se acumula en el núcleo e interactúa con COP1, evitando la degradación de HY5. Este factor junto con HYH activa la transcripción de varios genes de respuesta a UV-B. Por otro lado, FHY3 junto a HY5 se unen al promotor de *COP1* en presencia de UV-B para inducir su expresión. RUP1 y RUP2 actúan como elementos reguladores de retroalimentación negativa dado que rompen la interacción entre UVR8 y COP1. Adaptado de Tilbrook y col. (2013).

La vía regulada por las MAP quinasas se encuentra también muy conservada. Las MAP quinasas MPK3 y MPK6 son activadas en condiciones de estrés por UV-B, en particular como consecuencia de la acumulación de dímeros de pirimidina (González Besteiro y Ulm, 2013). La fosfatasa MKP1 de *Arabidopsis* regula negativamente la actividad de dichas MPK desfosforilándolas, y se ha reportado que las plantas mutantes *mkp1* son hipersensibles a la radiación UV-B, debido a la falta de inactivación de las MPK3 y MPK6. La MKP1 también actúa como un regulador del ciclo celular, dado que regula la acumulación de una ciclina mitótica asociada al daño en el ADN, la CYCB1;1 (González Besteiro y Ulm, 2013). Por último, González Besteiro y Ulm (2013) reportaron que las vías ATR y MKP1 actúan en paralelo luego de la exposición con UV-B; sin embargo, ATR actúa principalmente en la raíz mientras que MKP1 opera principalmente en las hojas.

1.2 Efectos de la radiación UV-B en las plantas

Numerosos estudios han examinado el efecto de la radiación UV-B en plantas, utilizando distintas especies en diversos estadios de desarrollo, varias condiciones de crecimiento y tratamientos, ya sea en el campo, en invernadero o en cámaras con temperatura y humedad controladas y una gran variedad de fuentes de radiación UV-B con distintas calidades espectrales y duración de la exposición al UV-B (Jenkins, 2009). De la gran variedad de estudios realizados se pueden resaltar algunos aspectos generales.

1.2.1 Cambios en el desarrollo y arquitectura de las plantas

La radiación UV-B afecta distintos procesos del desarrollo y modifica la arquitectura de las plantas. En general, luego de la exposición con UV-B, se observa una reducción de la biomasa, del largo y del área de las hojas (Farooq y col., 2005; Zinser y col., 2007; Casadevall y col., 2013; Reddy y col., 2013; Takshak y Agrawal, 2014), un aumento de las ramas auxiliares (Meijkamp y col., 2001), clorosis y necrosis (Farooq y col., 2005; Takshak y Agrawal, 2014); como así también una inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Takshak y Agrawal, 2014;). Además, altas intensidades de UV-B causan retraso en la floración en plantas de trigo (Zinser y col., 2007). A nivel celular, el UV-B puede impedir la progresión del ciclo celular, la inhibición de la expansión celular o una combinación de ambos efectos (Casadevall y col., 2013). Además, el UV-B puede promover la síntesis de una gran cantidad de metabolitos secundarios, incluyendo la acumulación de compuestos fenólicos que absorben a la radiación UV-B y actúan como barreras al paso de dicha radiación al interior de los tejidos (Liu y col., 2015).

1.2.2 Respuestas de estrés inducidas por altas intensidades de UV-B

La respuesta a la radiación UV-B en las plantas es dependiente del tratamiento de UV-B realizado, es decir, la duración y la longitud de onda utilizada. En general, como se mencionó anteriormente, tratamientos con UV-B de alta intensidad inducen respuestas de estrés relacionadas con el daño en el ADN y el metabolismo oxidativo (Jenkins, 2009; Besteiro y col., 2011).

1.2.2.1 Daños en el ADN producidos por la radiación UV-B y mecanismos de reparación

La radiación UV-B puede dañar directamente al ADN, debido a que la absorción de la radiación induce la formación de dímeros de pirimidinas adyacentes, resultando en dos tipos de daño: en mayor medida los dímeros de pirimidinas por formación de anillos de ciclobutano (DPCs) y, en menor medida, los 6-4 fotoproductos (6-4 PP) (Figura 2) (Jansen y col., 1998; Rastogi y col., 2010; Parihar

y col., 2015). Ambos tipos de dímeros bloquean la replicación del ADN e interfieren con la síntesis del ARNm durante la transcripción. El daño en el ADN es citotóxico y mutagénico para las células, y si no es removido puede causar la muerte celular (Tuteja y col., 2001; Sancar y col., 2004). Por ello, la reparación del daño en el ADN causado por la radiación UV-B es crucial para todos los organismos vivos. Las plantas poseen diferentes mecanismos para reparar los fotoproductos, entre ellos se encuentran la fotorreactivación que involucra fotoliasas dependientes de luz y el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) que no requiere de luz.

Arabidopsis thaliana posee dos fotoliasas específicas para la fotorreactivación de los DPCs y 6-4 PP, que tienen la capacidad de unirse específicamente al ADN dañado y provocar la monomerización del dímero utilizando la energía de la luz

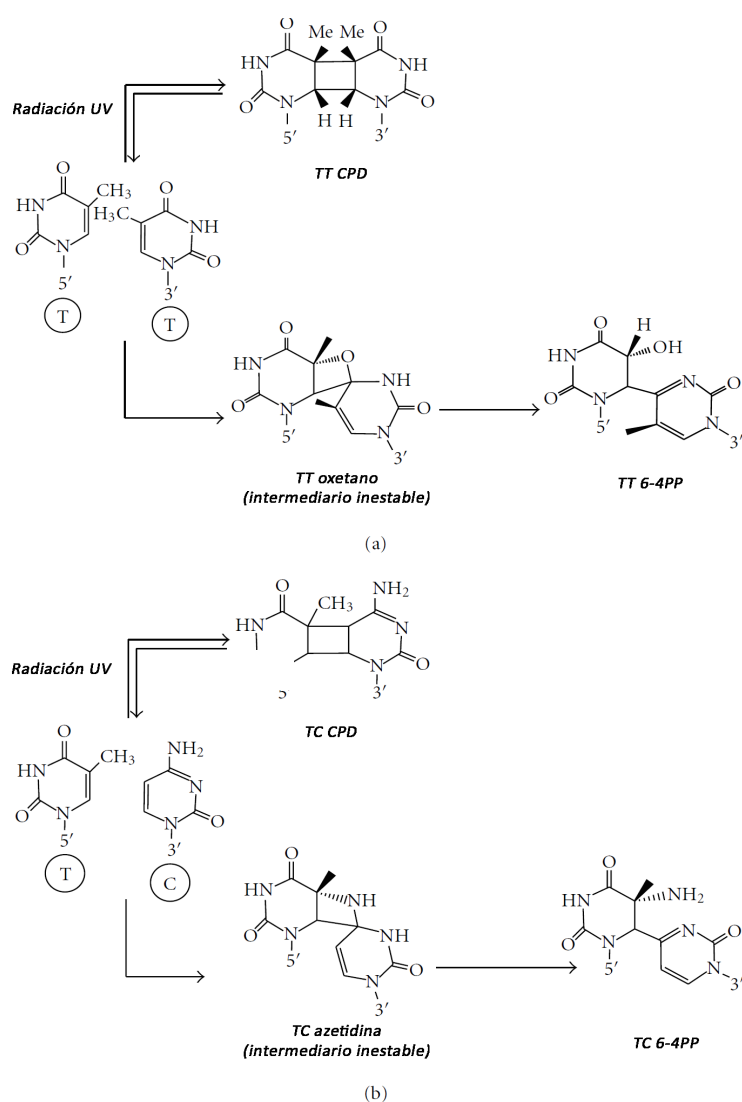


Figura 2. Formación de dímeros de pirimidina. El mecanismo para la formación de dímeros con formación de anillo de ciclobutano (DPCs) y fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona se muestra para dos timinas adyacentes en (a) y para una timina seguida de una citosina en (b). Adaptado de Rastogi y col. (2010).

visible (Rastogi y col., 2010). Los genes que codifican para la DPC y 6-4 PP fotoliasas son *UVR2* y *UVR3*, respectivamente; se ha reportado que plantas mutantes *uvr2* y *uvr3* son incapaces de remover los dímeros de pirimidina y que son más sensibles a la radiación UV-B que las plantas salvajes (Jiang y col., 1997; Landry y col., 1997).

Por otro lado, se ha identificado que el FADH reducido y la pterina reducida son dos cofactores necesarios para la actividad de la fotoliasa de DPCs; y que los niveles de la fotoliasa de DPCs varían según el tejido y la edad de la planta, en *Arabidopsis* se han reportado mayores niveles en flores y hojas de 3 a 5 semanas (Waterworth, 2002). Además, tanto la luz blanca con la radiación UV-B inducen la expresión de la fotoliasa de DPCs en *Arabidopsis*, a diferencia de lo que ocurre para la fotoliasa que repara los 6-4 PP, dado que tiene expresión constitutiva y no es regulada por luz (Waterworth, 2002). Li y col. (2015) reportaron que la expresión de la fotoliasa de DPCs está regulada por múltiples vías de señalización, incluyendo las vías dependientes e independientes de UVR8.

El proceso de reparación en oscuridad, denominado así porque ocurre en ausencia de luz, incluye la reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés “Nucleotide Excision Repair”), la reparación por escisión de bases (BER, del inglés “Base Excision Repair”) y otras vías de reparación del ADN. Los DPCs y 6-4 PPs distorsionan la hélice y son reconocidas por el NER, el cual a continuación cataliza la incisión de la hebra dañada a cada lado de la lesión, la escisión del oligonucleótido que contiene el sitio dañado, y finalmente se produce la síntesis de ADN por una ADN polimerasa para completar la hebra faltante, y la ligación por una ADN ligasa (Figura 3) (Kimura y Sakaguchi, 2006). Los genes de *Arabidopsis* involucrados en la reparación del daño en el ADN por UV-B fueron identificados utilizando mutantes sensibles a esta radiación. Las plantas mutantes *uvr1*, *uvr5*, *uvr7* (del inglés “UV repair defective”) y *uvh1* (del inglés “ultraviolet hypersensitive”) son deficientes en la reparación por escisión de nucleótidos (Jiang y col., 1997; Britt y Fiscus, 2003). El gen *UVH1* codifica para una proteína homologa a RAD1 de *Saccharomyces cerevisiae* y XPF de humanos y posee actividad endonucleasa (Liu y col., 2000). Por otro lado, la proteína UVR7 es homóloga a ERCC1 de humanos. Mutantes en el gen que codifica para esta proteína son sensibles a la radiación y a la UV-B (Hefner y col., 2003). UVH6 presenta una secuencia similar a XPD de humanos y a RAD53 de levaduras, las cuales son 5'-3'ADN helicasas necesarias para la reparación en el mecanismo NER. La proteína UVH6 juega un papel importante en la reparación del ADN, ya que abriría las hebras de ADN alrededor del daño; el gen *UVH6* se requiere para la resistencia a la radiación UV-B y es esencial

en Arabidopsis (Liu y col., 2003). Por último, la proteína UVH3 de Arabidopsis es homóloga a XPG de humanos, la cual codifica para una endonucleasa requerida para la reparación por escisión de nucleótidos de los daños causados por la radiación UV.

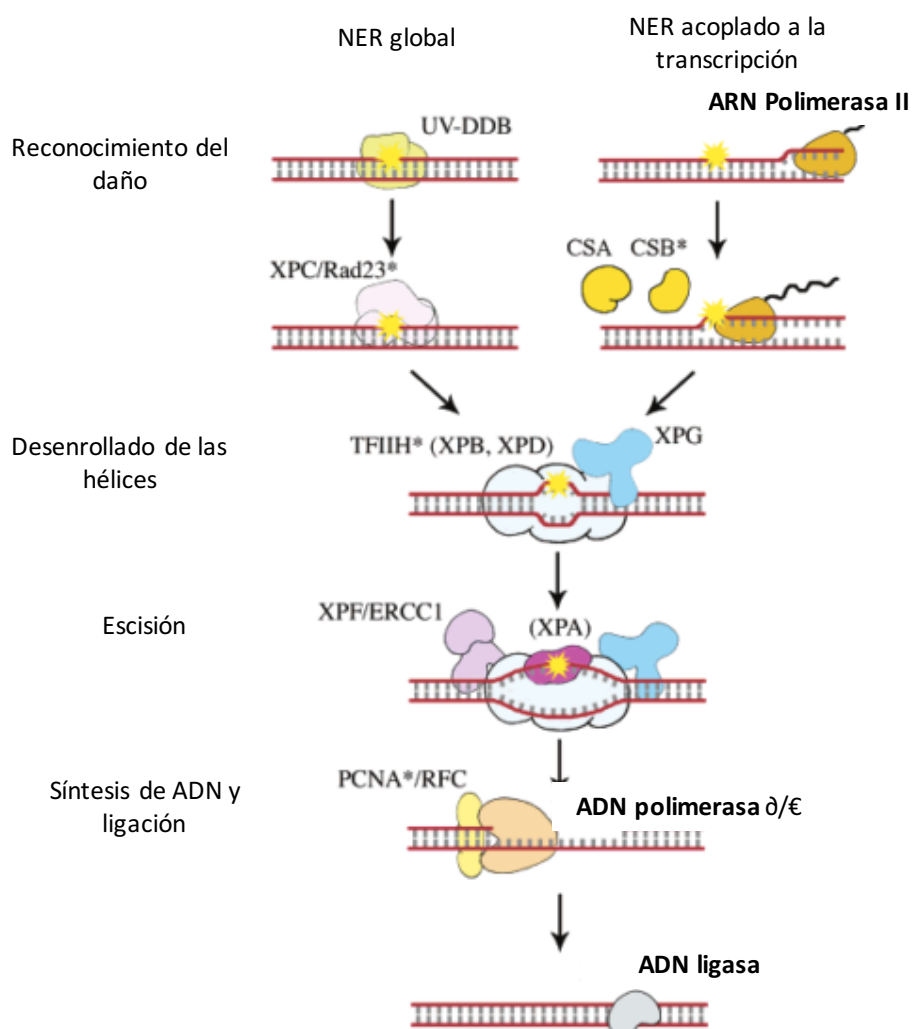


Figura 3. Representación esquemática de los pasos del sistema NER en humanos. La helicasa XPD desenrolla las hélices de ADN para permitir el ingreso del complejo endonucleasa XPF/ERCC1, responsable de las incisiones en la región 5' de la lesión en el ADN. Adaptado de Kimura y Sakaguchi (2006).

1.2.2.2 Producción de especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (EROs), tales como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete, el radical hidroxilo y el radical superóxido, no sólo son productos inevitablemente generados por la fotosíntesis, sino que también son generados como respuesta frente a algunos tipos de estreses bióticos y abióticos, incluyendo la radiación UV-B (Mackerness y col., 2001; Han y col., 2009; Takshak y

Agrawal, 2014). La acumulación de estos compuestos puede causar daño en las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y el ADN (Gill y Tuteja, 2010), y por lo tanto, puede llevar a la muerte celular (Mackerness y col., 2001), pero también puede iniciar respuestas de señalización que podrían conducir a la síntesis de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (A.-H.-Mackerness, 2000), o a inducir la expresión de nuevos genes (Gill y Tuteja, 2010).

Es importante tener en cuenta que las EROs pueden causar daño o actuar como factores de protección o de señalización dependiendo del equilibrio entre la producción y la eliminación de dichas especies, como así también de la edad de la planta, la localización de las EROs, entre otras (Gill y Tuteja, 2010). Las plantas han desarrollado mecanismos efectivos para modular los niveles de EROs, y la mayoría de ellas los elimina utilizando una combinación de enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la catalasa y la glutatión reductasa, y la producción de moléculas antioxidantes no enzimáticas como el ascorbato, el glutatión, los carotenoides, los fenoles y los tocoferoles (Mittler y col., 2004; Gill y Tuteja, 2010). Las plantas responden al estrés oxidativo inducido por UV-B aumentando la actividad de enzimas antioxidantes y modificando los niveles de moléculas antioxidantes (Figura 4) (Gao y Zhang, 2008; Han y col., 2009; Berli y col., 2010). Takshak y Agrawal (2014) reportaron que en *Withania somnifera*, luego de la exposición al UV-B, la actividad aumentada de la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede aumentar los niveles de H_2O_2 , el cual puede reaccionar con el radical superóxido y producir el radical hidroxilo, el cual es la especie más reactiva del oxígeno y puede ser el responsable de la peroxidación lipídica en las hojas expuestas a la radiación UV-B. Además, se ha reportado que la radiación UV-B induce el daño oxidativo, la peroxidación lipídica y la actividad de la superóxido dismutasa, la catalasa, la peroxidasa y la polifenol oxidasa en hojas de *Cassia auriculata* (Agarwal, 2007). Por otra parte, plantas mutantes deficientes en ascorbato (*vtc1*), el cual juega un papel crucial en el mecanismo antioxidante, son sensibles al UV-B (Gao y Zhang, 2008), demostrando nuevamente la importancia de la maquinaria antioxidante en la respuesta a esta radiación.

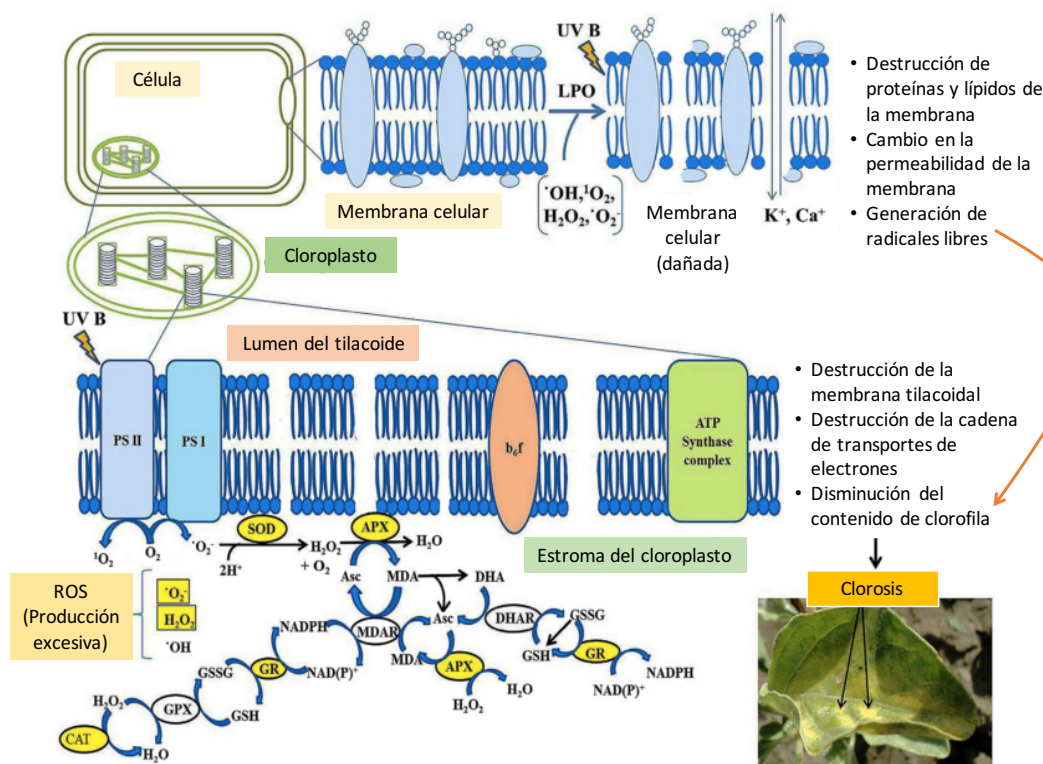


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes tipos de EROs y enzimas antioxidantes generados luego del tratamiento con UV-B que inducen respuestas de estrés. Asc: ascorbato, CAT: catalasa, CHA: dihidroascorbato, APX: ascorbato peroxidasa, DHAR: dihidroascorbato reductasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, LPO: peroxidación lipídica, MDA: malondialdehído, MDAR: malondialdehído reductasa, $\cdot O_2$: oxígeno singlete, $\cdot OH$: radical hidroxilo, POXs: peroxidasas, PS I: fotosistema I, PS II: fotosistema II, SOD: superóxido dismutasa, Toc: tocoferol. Adaptado de Takshak y Agrawal (2014).

1.2.3 Efectos de la radiación UV-B en interacción con otras variables ambientales

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende en gran medida de los cambios climáticos globales y de los estreses abióticos y bióticos a los que ellas se encuentran expuestas. Por lo tanto, la respuesta de las plantas a la radiación UV-B puede estar condicionada por la interacción con otros factores ambientales. Numerosos reportes han demostrado que el UV-B puede interaccionar con otras variables y así inducir una respuesta diferencial o más pronunciada. Por ejemplo, se ha demostrado que la reducción de la biomasa, la inhibición del crecimiento y la disminución del contenido de clorofilas son atenuados cuando las plantas son expuestas a temperaturas levemente cálidas en combinación con el tratamiento con UV-B (Han y col., 2009; Randriamanana y col., 2014). Además, se ha demostrado que la concentración de H_2O_2 , MDA y la velocidad de producción del radical superóxido disminuyen significativamente cuando las plantas son expuestas paralelamente al UV-B y a temperaturas cálidas (Han y col., 2009). Por otro lado, tratamientos elevados de CO_2 en plantas de maíz mejoran los efectos adversos en

el área de la hoja, en el contenido de clorofila y carotenoides y en la fotosíntesis neta causados por la radiación UV-B (Wijewardana y col., 2016). Por el contrario, tratamientos combinados de sequía y radiación UV-B causan efectos aditivos; por ejemplo se ha observado un mayor retraso en la maduración de frutos y una mayor reducción de la fotosíntesis cuando ambos tratamientos fueron aplicados en forma combinada en comparación con cada tratamiento individual (Martínez-Lüscher y col., 2013; Alonso y col., 2015). Por último, la exposición conjunta de las plantas al UV-B y a metales pesados como el níquel reduce en mayor medida el crecimiento y la actividad fotosintética (Srivastava y col., 2012).

1.2.4 Cambios en la expresión génica inducidos por UV-B

La mayoría de los efectos sobre la fisiología, el crecimiento y el desarrollo que se observan luego del tratamiento con radiación UV-B son consecuencia de cambios en la expresión génica. Si bien muchos de los cambios observados en los perfiles de expresión varían en función de la especie, el tipo de tratamiento y la forma de cultivo (a campo o en invernadero), hay ciertos cambios observados que son comunes.

Los transcriptos que presentan cambios similares por la radiación UV-B pueden ser agrupados según la función o la localización de las proteínas correspondientes: (a) Proteínas localizadas en el cloroplasto, que incluyen fundamentalmente proteínas asociadas a la fotosíntesis, (b) Proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides, (c) Proteínas involucradas en la transducción de señales y factores de transcripción, (d) Proteínas asociadas al metabolismo oxidativo, (e) Proteínas asociadas al metabolismo de la pared celular y (f) Proteínas asociadas al metabolismo del ADN.

Con respecto al primer grupo de transcriptos, Chen y col. (2014) observaron que la radiación UV-B reprime la expresión de la proteína D1 del fotosistema II (*psbA*), así como también la de la plastocianina y la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa en hojas de *Lycium ruthenicum*. Además, Liu y col. (2015) reportaron que los transcriptos de la ribulosa-3-fosfato epimerasa, una proteasa ATP dependiente, de la rubisco, de algunas proteínas del fotosistema II (*Psb*) y *Lhcl* (del inglés "light-harvesting complex I") disminuían luego de la exposición con UV-B. Consistentemente, diferentes estudios demostraron que en distintas especies vegetales el proceso de fotosíntesis se encuentra afectado por la radiación UV-B (Lidon y Ramalho, 2011; Martínez-Lüscher y col., 2013), mostrando reducciones superiores al 80% en la fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la capacidad fotosintética. Del mismo modo, se produce una disminución en el contenido de las xantófilas, de los carotenos, de la

clorofila a y la clorofila total y un aumento en el nivel de lipoperoxidación de las membranas de los cloroplastos (Lidon y Ramalho, 2011).

Por otro lado, la exposición con radiación UV-B aumenta la transcripción de genes necesarios para reducir el impacto de esta radiación sobre las plantas. Dentro de este grupo de genes se encuentran los que codifican enzimas para la síntesis de pigmentos que reducen la penetración de la luz UV-B a los tejidos, como algunos flavonoides y otros metabolitos secundarios. Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen una gran variedad de funciones (Winkel-Shirley, 2002), entre ellas la capacidad de filtrar la radiación UV-B. El aumento del contenido de compuestos que absorben el UV-B como los flavonoides, las antocianinas y los carotenoides es uno de los mecanismos de defensa más importante para las plantas en respuesta a esta radiación (Chen y col., 2014); de esta manera, plantas mutantes en la vía de flavonoides muestran elevada sensibilidad a la radiación UV-B (Li y col., 1993; Landry y col., 1995). La radiación UV-B induce la expresión de *F3H* (*flavanona-3-hidroxilasa*), *UGaIT* (*UDP-glucosa-flavonoid-3-O -glucosiltransferasa*), *CHS* (*chalcona sintasa*), *LAR* (*leucoantocianidin reductasa*), *DFR* (*dihidroflavonol reductasa*) y *FGT* (*flavonoid glucosiltransferasa*) en maíz (Casati y Walbot, 2003), *Arabidopsis* (Brown y col., 2005; Brown y Jenkins, 2007; Kilian y col., 2007), *Lycium ruthenicum* (Chen y col., 2014) y *Reaumuria soongorica* (Liu y col., 2015), entre otros genes de la vía de biosíntesis de los flavonoides. La chalcona sintasa es la primera enzima de la vía de síntesis de los flavonoides (Winkel-Shirley, 2002) y su inducción luego de la exposición a la radiación UV-B es dependiente de la vía activada por el fotorreceptor UVR8 (Brown y col., 2005). Además de los flavonoides, los ésteres de sinapatos son una clase de fenilpropanoides que también poseen la capacidad de absorber la radiación UV-B. El factor de transcripción MYB4 es un represor transcripcional de la expresión de *C4H* (*CINAMATO-4-HIDROXILASA*) en *Arabidopsis*, y cuando MYB4 se expresa se observa una disminución en los niveles de los ésteres de sinapatos (Jin y col., 2000). De esta manera, las plantas mutantes *myb4* son tolerantes a la radiación UV-B debido a que las mismas poseen niveles aumentados de ésteres de sinapatos (Jin y col., 2000). Además, Chen y col. (2014) mostraron que la expresión de *COMT* (*CAFEATO-O-METILTRANSFERASA*), una enzima de la vía de formación de ésteres de sinapatos, se encuentra aumentada en plantas de *Arabidopsis* irradiadas con UV-B. Por otro lado, esta enzima también participa en la vía de síntesis de la lignina, y estudios realizados por Takshak y Agrawal (2014) demostraron que el contenido de lignina aumenta por UV-B en *Withania somnifera*.

Algunos transcritos que codifican proteínas involucradas en la transducción de señales y factores de transcripción se encuentran regulados por la radiación UV-B, como por ejemplo, transcritos que codifican diferentes tipos de proteínas quinasas, proteínas de unión a GTP, proteínas de unión a calcio; como así también factores de transcripción del tipo WRKY o factores de transcripción involucrados en la vía de señalización del etileno (Casati y Walbot, 2003; Brown y Jenkins, 2007; Kilian y col., 2007; Wang y col., 2007; Liu y col., 2015). Consistentemente, Wang y col. (2007) demostraron que la sobreexpresión del factor de transcripción WRKY89 aumenta la tolerancia a la radiación UV-B en plantas de arroz. Además, estas plantas tienen aumentada la expresión de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de fenilpropanoides como así también mayor acumulación de lignina y ácido salicílico. Otro grupo de genes que se encuentran en algunos casos regulados positivamente por la radiación UV-B son aquellos que codifican proteínas involucradas en respuestas frente al estrés oxidativo. Mackerness y col. (2001) mostraron que la radiación UV-B es capaz de inducir la formación de especies EROs, y que el anión superóxido producido induce genes de respuesta a patógenos, como la defensina *PDF1.2*. Por otro lado, demostraron que el peróxido de hidrógeno derivado del anión superóxido es el responsable de la regulación negativa de genes involucrados en la fotosíntesis como *Lchb*. Las plantas han evolucionado distintos mecanismos de protección frente a las EROs, como por ejemplo la producción de superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD) que permiten la remoción del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno, respectivamente (Chen y col., 2014). Acorde a esto, la expresión de *SOD*, *POD* y *APX* (*ASCORBATO PEROXIDASA*) aumenta luego de la exposición a la radiación UV-B en *Lycium ruthenicum*. (Chen y col., 2014; Pan y col., 2014).

Por otra parte, algunos transcritos de proteínas asociadas al metabolismo de la pared celular se encuentran aumentados luego de la exposición con UV-B, incluyendo la *beta-galactosidasa*, la *glicósido hidroxilasa*, la *xiloglucano endotransglicosilasa*, la *corismato mutasa* (Casati y Walbot, 2003; Chen y col., 2014) y *LTPs* (del inglés "Lipid transfer protein") en *Lycium ruthenicum*, estas proteínas se encuentran en la pared de las células epidérmicas y pueden estar involucradas en la síntesis de ceras cuticulares o de las capas de cutina (Chen y col., 2014). Por lo tanto, los cambios en la composición de la pared celular podrían reducir la penetración de la radiación UV-B en las hojas, o bien permitir la modificación del tamaño o la forma de las mismas.

Por último, en diferentes variedades de maíz de altas altitudes, Casati y col. (2006) identificaron, mediante estudios de microarreglos, una serie de genes que

aumentan su expresión luego del tratamiento por UV-B en estas variedades y no lo hacen o lo hacen a mayores intensidades de UV-B en líneas provenientes de bajas altitudes. Entre ellos se encuentran un número de transcritos que codifican para proteínas involucradas en el remodelado de la estructura de la cromatina y de la reparación del ADN, como por ejemplo algunas histonas acetiltransferasas y deacetilasas. Además, Kilian y col. (2007) observaron un aumento del transcrito *PHR1/UVR2* por UV-B, que codifica para la fotoliasa de los DPCs.

2 Capítulo 1: “Estudio del rol de enzimas que participan en la acetilación de histonas en las respuestas frente a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*”

2.1 Introducción

2.1.1 Estructura de la cromatina

El ADN de los organismos eucariotas está empaquetado en el núcleo celular asociado a proteínas formando la cromatina. La unidad básica repetitiva de la cromatina es el nucleosoma, el cual está constituido por un complejo octamérico formado por proteínas básicas denominadas histonas, en el cual se enrollan 146 pb del ADN. Cada nucleosoma está conectado al siguiente por un fragmento de ADN espaciador de aproximadamente 160-240 pb. Las histonas han sido estructuralmente conservadas a lo largo de la evolución y llevan a cabo dos funciones vitales; por un lado, empaquetar las moléculas de ADN dentro de los límites del núcleo eucariota para proteger al genoma de los daños físicos, y por otro lado, permitir que el ADN se encuentre accesible para expresar los genes en los momentos adecuados (Rosa y Shaw, 2013).

La partícula octamérica está formada por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (McGinty y col., 2014). Además, cerca de 20 pb del ADN espaciador se asocian con una única "histona de unión" H1 o H5 (Rosa y Shaw, 2013; McGinty y col., 2014) (Figura 5). Las histonas que conforman el octámero son relativamente pequeñas (102 a 135 aminoácidos), muy conservadas y poseen una alta proporción de aminoácidos básicos que le confieren una carga neta positiva a pH fisiológico (McGinty y col., 2014). Tienen una región central rica en hélices α , flanqueada por extensiones N y C terminales. Algunas de estas extensiones son muy estructuradas, aunque otras, especialmente los dominios N terminales de todas las histonas, y el dominio C terminal de H2A son muy flexibles. Estas "colas" se extienden desde el nucleosoma y albergan una gran densidad y diversidad de modificaciones postraduccionales que contribuyen con la unión del ADN y al plegado de orden superior y/o a la oligomerización de la cromatina a través de la unión a nucleosomas adyacentes (McGinty y col., 2014). Las histonas H1 y H5 son similares a las otras, con un dominio globular central, aunque son un poco más grandes y están menos conservadas entre los organismos. Éstas se unen al ADN desde el exterior del nucleosoma, estabilizando la estructura (McGinty y col., 2014).

La cromatina sigue un orden jerárquico de estructuración que puede dividirse en tres niveles: primario, secundario y terciario. La estructura primaria comprende el arreglo lineal de nucleosomas. El siguiente nivel se define por la compactación local de un arreglo de nucleosomas en una fibra de 30 nm de diámetro. En el tercer nivel estructural, la estructura de la cromatina describe los contactos entre hebras entre los elementos estructurales secundarios (McGinty y col., 2014). El estado de

estructuración de la cromatina influye en procesos importantes como la expresión de los genes, la replicación, la recombinación y la reparación del ADN. En estados más condensados (heterocromatina), la accesibilidad de las proteínas requeridas para estos procesos está limitada, mientras que no lo está en la cromatina en una forma más laxa (eucromatina). Estos estados de condensación se producen por cambios en las interacciones entre las histonas, entre las histonas y el ADN, o entre estos y otros factores proteicos.

Dos de las modificaciones más importantes que regulan el estado de condensación de la cromatina son la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas.

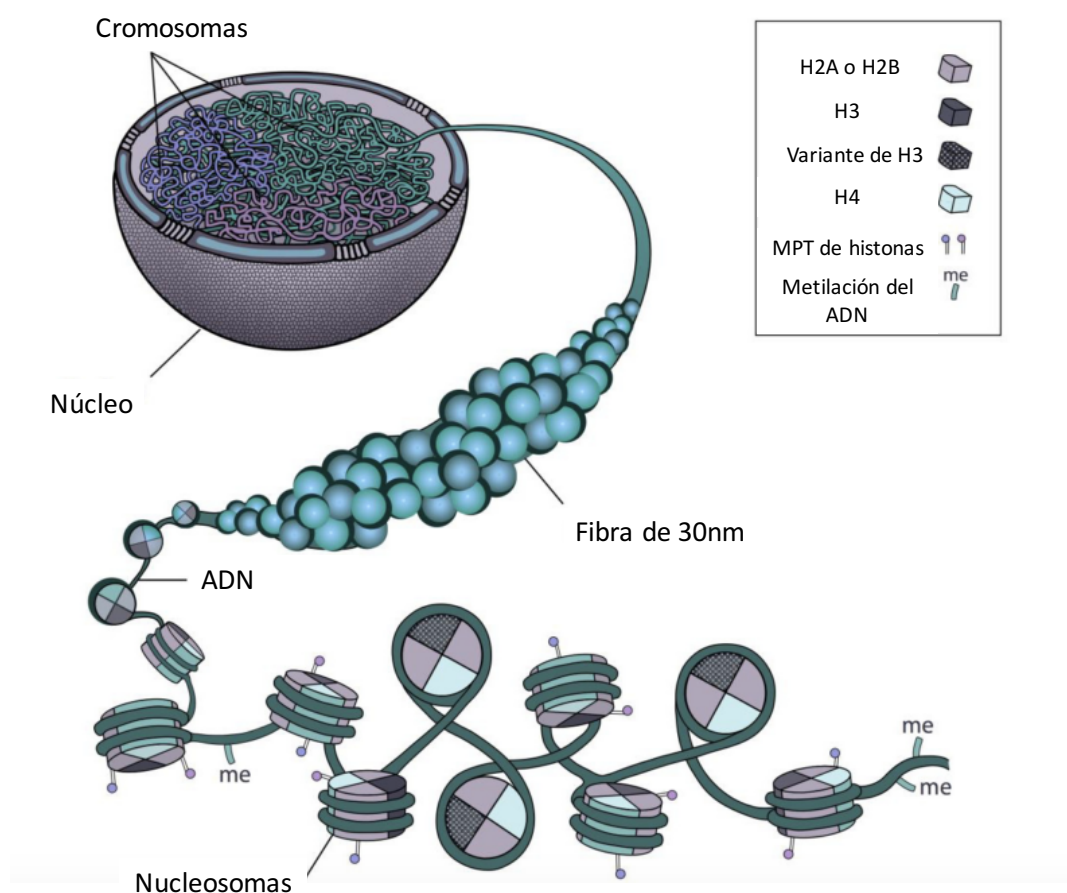


Figura 5. Esquema representativo de la organización de la cromatina. MPT: modificaciones postraduccionales de las histonas. Adaptado de Rosa y Shaw (2013).

2.1.1.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN en 5-metilcitosina es una de las marcas epigenéticas más estudiadas implicadas en la regulación de la expresión génica.

En vertebrados, plantas y algunos hongos, la metilación del ADN ocurre casi exclusivamente en el dinucleótido CG. Sin embargo, las plantas también poseen niveles importantes de 5-metilcitosina en secuencias simétricas CNG y secuencias asimétricas CNN, en donde N puede ser adenina, timina o guanina. La enzima encargada de la metilación es una ADN metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina a las citosinas del ADN (Finnegan y Kovac, 2000). La metilación puede ser “de novo” o de mantenimiento. La metilación “de novo” es un proceso en el que se metilan los residuos de citosina que previamente no estaban metilados, resultando en la formación de nuevos patrones de metilación, y la metilación de “mantenimiento” es el proceso por el cual los patrones de metilación preexistentes se mantienen después de la replicación del ADN (Chen y Li, 2004). La metilación está controlada por ARNs pequeños de interferencia (siRNA) e involucra dos vías que se solapan para controlar la iniciación y el establecimiento de la metilación de ADN (Law y Jacobsen, 2010). En *Arabidopsis thaliana*, la metilación de novo es dependiente de la actividad metiltransferasa de DRM1 y DRM2 (del inglés “Domains rearranged methyltransferase 1 and 2”). En cambio, la metilación de mantenimiento de CG involucra a las metiltransferasas MET1 (del inglés “methyltransferase 1”), DDM1 (del inglés “decrease in DNA methylation 1”) y a la histona deacetilasa HDA6, mientras que la metilación de mantenimiento de CNG y CNN requiere a las metiltransferasas CMT3 (del inglés “chromomethylase 3”) y DRM1/DRM2 (Chan y col., 2005).

En plantas, la metilación del ADN regula diferentes fenómenos epigenéticos, como el silenciamiento transcripcional de transposones y el silenciamiento de genes (Chan y col., 2005) y está mediada por la actividad conjunta de ADN metiltransferasas junto con ADN demetilinas (Law y Jacobsen, 2010).

La remoción de los metilos del ADN puede ocurrir por dos mecanismos diversos: 1) las citosinas metiladas pueden ser remplazadas por citosinas no modificadas durante la replicación del ADN, lo que se denomina demetilación pasiva; 2) los metilos pueden ser removidos por glicosilasas, lo que se denomina demetilación activa (Law y Jacobsen, 2010). La demetilación activa en plantas es llevada a cabo por la actividad de ADN glicosilasas, probablemente en combinación con la vía de reparación por escisión de bases (BER). En *Arabidopsis thaliana* los miembros de la familia de ADN glicosilasas son DME (del inglés: “DEMETER”) y ROS1 (del inglés: “REPRESSOR OF SILENCING 1”), las cuales tienen tanto

actividad glicosilasa como liasa. La actividad glicosilasa remueve la base 5-metilcitosina del ADN, y la actividad liasa rompe la hebra de ADN en el lugar donde se encontraba la citosina metilada (Law y Jacobsen, 2010).

2.1.1.2 Modificaciones postraduccionales de histonas

Las histonas contienen colas N-terminales flexibles que se extienden por fuera del nucleosoma y son susceptibles de ser modificadas postraduccionalmente. Aunque las colas de las histonas son los sitios principales de modificación, los dominios que se encuentran en el centro de estas proteínas también pueden ser modificados (Rosa y Shaw, 2013). Se han identificado al menos ocho tipos de modificaciones postraduccionales de las histonas. Algunas están bastante bien caracterizadas como la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, mientras que otras como la sumoilación, ADP ribosilación, deiminación, isomerización de prolinas, han sido poco estudiadas (Kouzarides, 2007). Con respecto a la transcripción, las modificaciones de las histonas pueden conllevar a la activación o a la represión de un gen. En general, la acetilación y la fosforilación se correlacionan con la activación, mientras que la sumoilación, deiminación y la isomerización de residuos de prolinas fueron asociadas con la represión transcripcional. Otras modificaciones como la ubiquitinación y la metilación se han correlacionado tanto con la activación como con la represión transcripcional (Rosa y Shaw, 2013).

En los últimos años se ha incrementado el número de modificaciones de histonas identificadas, como así también los sitios donde ocurren esas modificaciones. Múltiples modificaciones pueden ser agregadas simultáneamente en el mismo nucleosoma en distintas histonas o en la misma cola de histona, creando una gran cantidad de posibilidades de regulación y un enorme potencial para respuestas funcionales, dado que el momento de aparición de una modificación dependerá de las condiciones de señalización dentro de la célula (Lee y col., 2010; Kouzarides, 2007).

Las modificaciones de las histonas son causadas por la acción directa de enzimas que han sido caracterizadas para casi todos los tipos de modificaciones en humanos y levaduras (revisadas en Kouzarides, 2007) y para algunas modificaciones en las plantas, como la ubiquitinación, la metilación y la acetilación (Tsankova y Nestler, 2010; Berr y col., 2011).

2.1.1.2.1 Ubiquitinación de histonas

La ubiquitinación consiste en el agregado de una proteína pequeña y altamente conservada, denominada ubiquitina, a una proteína blanco. Este proceso

requiere de la acción de 3 enzimas: la enzima de activación E1, de conjugación E2 y de ligación E3. En un primer paso, en una reacción dependiente de ATP, la ubiquitina es activada y unida a la enzima E1. Luego, la ubiquitina activada es conjugada con la enzima E2 a través de un enlace tioéster a un residuo de cisteína de E2. Por último, E2 interacciona con E3 y la ubiquitina es transferida a un residuo de lisina de la proteína blanco. Finalmente, la proteína sustrato puede resultar monoubiquitinada o se le puede agregar una cadena de ubiquitinas resultando en la poliubiquitinación de la misma. La ubiquitinación puede servir como señal para que la proteína blanco sea degradada o puede servir como señal para algún otro mecanismo, que puede depender en algunos casos de otros factores como por ejemplo la localización subcelular de la proteína sustrato (Pickart, 2001).

Las histonas son susceptibles de ser monoubiquitinadas y esta modificación es considerada como una marca epigenética en eucariotas. Mientras la monoubiquitinación de H2A se asocia generalmente con la represión de la transcripción, la ubiquitinación de H2B está involucrada en la activación transcripcional (Feng y Shen, 2014). La enzima E2 Rad6 y la enzima E3 Bre1 y sus homólogas son las encargadas de la ubiquitinación de H2B en diversos organismos eucariotas. En *Arabidopsis*, hay dos genes que codifican para Bre1 denominados *HUB1* y *HUB2* (del inglés “*Histone monoubiquitination 1 and 2*”) y tres genes codifican para Rad6 denominados *AtUBC1*, *AtUBC2* y *AtUBC3* (Cao y col., 2008; Berr y col., 2011). Cao y col. (2008) demostraron que *UBC1* y *UBC2*, a diferencia de *UBC3*, son redundantes y están involucrados en la regulación del tiempo de floración, dado que la expresión de *FLC* (del inglés “*Flowering Locus C*”) se encuentra reprimida en las plantas mutantes *ubc1*, *ubc2*, y en las dobles mutantes *ubc1 ubc2*.

Las enzimas encargadas de la deubiquitinación o las ubiquitin proteasas (UBPs) clivan la ubiquitina unida al sustrato (Berr y col., 2011). En *Arabidopsis*, de las 27 UBPs putativas, se ha demostrado que sólo la UBP26 se encuentra involucrada en la deubiquitinación de H2B (Sridhar y col., 2007).

2.1.1.2.2 Metilación de histonas

La metilación de las histonas juega un rol crucial en la regulación epigenética, dado que tiene un gran impacto en la regulación de la estructura y función de la cromatina (Yu y col., 2009). La metilación de las histonas puede ocurrir en los residuos de lisina 4, 9, 27, 36 y 79 de la histona H3 y en la lisina 20 de la histona H4. Además, los residuos de lisina pueden ser mono, di o trimetilados. En general, la metilación en H3K4, K36 y K79 se correlaciona con una transcripción

activa, mientras que la metilación en H3K9, K27 y H4K20 se asocia con el silenciamiento génico (Yu y col., 2009).

Todas las histonas metiltransferasas poseen un dominio de 130 aminoácidos denominado SET. Existe una gran cantidad de genes en plantas que poseen este dominio; de acuerdo con las bases de datos Pfam y ChromDB existen 45, 35 y 37 proteínas con dominios SET en Arabidopsis, maíz y arroz, respectivamente, las cuales fueron agrupadas en 6 grupos diferentes de acuerdo a la similitud de secuencia (Yu y col., 2009; Berr y col., 2011). A pesar de la gran cantidad de genes que poseen la secuencia SET, solo una pequeña cantidad de las proteínas fueron identificadas. Por ejemplo, en Arabidopsis una de las clases de proteínas mejor caracterizadas se denominan ATX (“Arabidopsis trithorax”) y ATXR (“Arabidopsis trithorax related”) y consiste en un grupo de 12 proteínas, de las cuales algunas se encuentran asociadas con distintas funciones biológicas. A modo de ejemplo, ATXR3 es capaz de trimetilar la histona H3 en la lisina 4 *in vitro* y es importante durante la formación del gametofito (Berr y col., 2010). Por otro lado, ATX1 también se encuentra asociada con H3K4me3, y mutantes *atx1* mostraron menor velocidad de germinación, mayor apertura estomática y menor tolerancia al estrés hídrico (Ding y col., 2011). Por último, plantas mutantes en *atxr7* mostraron floración temprana con una supresión de la expresión de *FLC* (Berr y col., 2009), demostrando una vez más que las modificaciones postraduccionales de las histonas son importantes para llevar a cabo diferentes procesos biológicos.

Los niveles de metilación de las histonas están regulados por las histonas metiltransferasas y las histonas demetilinas. Hay dos tipos de histonas demetilinas en eucariotas: KDM11/LSD1 (del inglés: “demethylase1/lysine specific demethylase1”), y las que poseen un dominio característico denominado JmjC (Jumonj C). Estudios recientes indicaron que las histonas deacetilasas tienen importantes roles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como el control del tiempo de floración, la respuesta a hormonas y la regulación del ritmo circadiano (Luo y col., 2014).

2.1.1.2.3 Acetilación de histonas

Una de las modificaciones postraduccionales de las histonas mejor caracterizada es la acetilación de uno o más residuos de lisina de las colas N-terminales (Rosa y Shaw, 2013). La acetilación/desacetilación de histonas es un proceso dinámico y reversible, y por lo tanto, es clave para la interconversión entre estados de transcripción activa y represiva. La acetilación de histonas involucra la transferencia de un grupo acetilo desde el acetil-CoA hacia un residuo de lisina, lo

que neutraliza la carga positiva de las colas de las histonas y reduce la afinidad con la carga negativa del ADN, promoviendo la unión de factores de transcripción al ADN (Servet y col., 2010). Por lo tanto, en general, la acetilación de las histonas se asocia con la transcripción activa de los genes, mientras que la desacetilación reprime la expresión de los mismos (Berger, 2007). En *Arabidopsis*, las lisinas 9, 14, 18, 23 y 27 de la histona H3, y las lisinas 5, 8, 12, 16 y 20 de la histona H4 son susceptibles de ser acetiladas (Earley y col., 2007; Zhang y col., 2007).

El nivel de acetilación está determinado por la actividad de las histonas acetiltransferasas (HATs) junto con la de las histonas deacetilasas (HDACs) (Figura 6). Basado en su localización subcelular, las HATs pueden ser divididas en dos clases: HAT-A y HAT-B. Las histonas acetiltransferasas del tipo A se localizan en el núcleo y acetilan las histonas que se encuentran formando los nucleosomas. Funcionan como co-activadores transcripcionales y por lo tanto juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica (Boycheva y col., 2014). En cambio, las histonas acetiltransferasas del tipo B se localizan en el citoplasma y catalizan la acetilación de histonas libres (no asociadas a ADN), y en general acetilan la lisina 5 y 12 de la histona H4. Su función está relacionada con la síntesis de cromatina y el ensamblado de nuevas histonas a los cromosomas (Boycheva y col., 2014). Por otro lado, también se ha reportado que este tipo de HAT acetila proteínas no histonas en *Arabidopsis*, como por ejemplo proteínas involucradas en la fotosíntesis y la respiración, demostrando que la acetilación puede ser un proceso importante que regula enzimas claves del metabolismo (Finkemeier y col., 2011).

En *Arabidopsis thaliana*, las HAT se dividen en 4 familias: la familia **GNAT** (del inglés “Gcn5-related N-acetyltransferase”), la cual posee 3 miembros denominados HAG1, HAG2 y HAG3; la familia **MYST** (denominada así por sus principales miembros: MOZ, Ybt2, Sas2, Tip60-like), la cual posee 2 miembros HAM1 y HAM2; la familia **p300/CBP** (del inglés “CREB-binding protein”), la cual posee 5 miembros denominados HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12; y la familia **TAF_{II}250** (subunidad del factor de transcripción general TFIID), la cual posee 2 miembros, HAF1 y HAF2 (Pandey y col., 2002). Por otro lado, las HDACs en *Arabidopsis* están codificadas por 18 genes y pueden ser agrupados en 4 tipos: RDP3 (del inglés “Reduced Potassium Dependency 3”), HDA1 (del inglés “Histone DeAcetylase 1”), SIR2 (del inglés “Silent Information Regulator 2”) y HD2 (del inglés “Histone Deacetylase 2”) (Shen y col., 2015).

La mayoría de las histonas acetiltransferasas y deacetilasas de *Arabidopsis* fueron estudiadas por su función en la modificación de la cromatina y la regulación epigenética de los genes de desarrollo y respuesta a estrés. Sin embargo, resulta interesante mencionar nuevamente que algunas de las HATs y HDAC no se localizan exclusivamente en el núcleo. Por ejemplo, se han encontrado miembros de las histonas deacetilasas en cloroplasto, mitocondria o citoplasma, mientras que otras se encuentran alternativamente en el núcleo o en el citoplasma, dependiendo de la presencia o ausencia de luz (Shen y col., 2015). En el caso de las histonas acetiltransferasas, la mayoría se encuentran principalmente en el núcleo, excepto HAG3, la cual se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Tran y col., 2012).

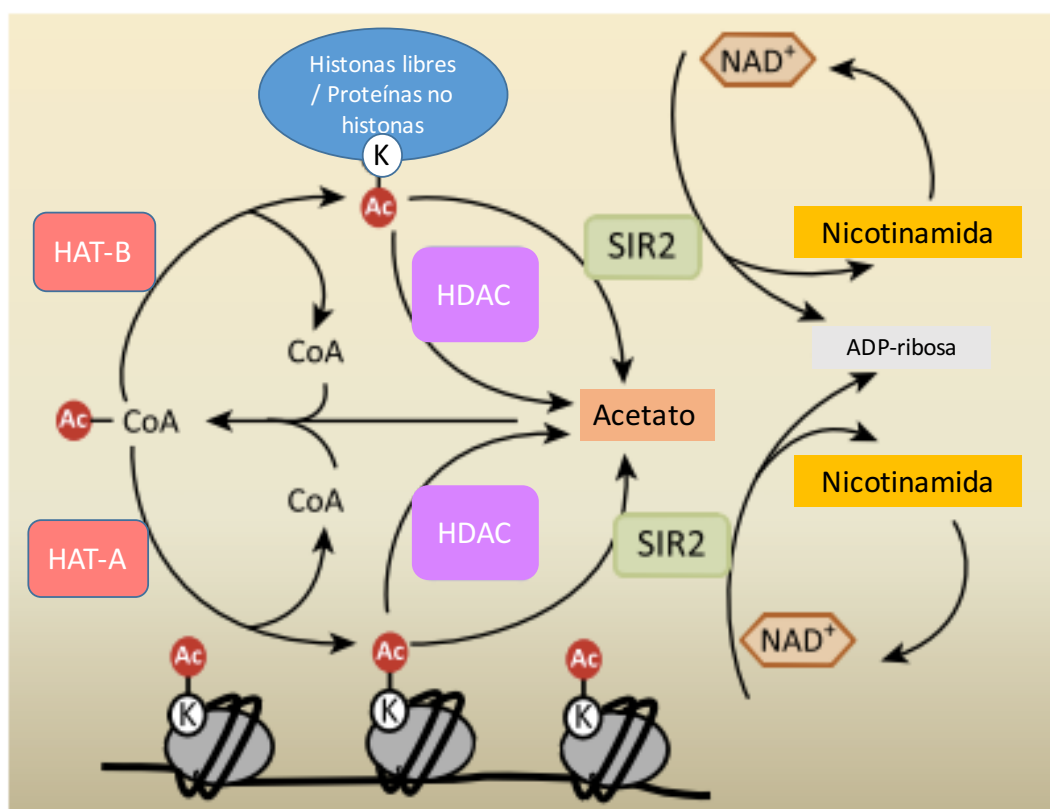


Figura 6. Esquema representativo de la actividad de las histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas deacetilasas (HDAC). Adaptado de Shen y col. (2015).

2.1.2 Rol de la acetilación de las histonas en la respuesta de las plantas a estímulos externos

Una gran cantidad de procesos biológicos, como la diferenciación celular, el crecimiento y el desarrollo de las plantas se encuentran influenciados por diversos factores ambientales como la luz, la temperatura, el estrés biótico y el abiótico. Las plantas, a diferencia de los animales, son organismos sésiles que se deben adaptar a los cambios del ambiente, y parte de las respuestas de adaptación están

mediadas por la acetilación o desacetilación de las histonas (Revisados en Chen y Tian, 2011).

La luz es uno de los factores ambientales más importantes que regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Franklin y Whitelam, 2004). Chua y col. (2001) reportaron que la activación transcripcional del gen de la plastocianina *PetE* inducido por la luz se encontraba asociado a la hiperacetilación de las histonas H3 y H4. Además, la floración es un proceso que se encuentra regulado por cambios en la cromatina. La trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 y la acetilación de las histonas se encuentran asociadas con la expresión activa de *FLC* (*Flowering locus C*), mientras que la desacetilación de las histonas y la dimetilación de la histona H3 en las lisinas 9 y 27 reprimen la expresión de este gen (He y Amasino, 2005).

Otros factores ambientales que pueden afectar el desarrollo de las plantas son las fluctuaciones de la temperatura durante su ciclo de vida. Las plantas han evolucionado y han desarrollado mecanismos de aclimatación al frío (Thomashow, 1999). CBF (del inglés “C-repeat binding factor”) es un co-activador transcripcional involucrado en la respuesta al frío que interacciona con la histona acetiltransferasa del tipo HAG1/GCN5 para estimular la transcripción de algunos genes de respuesta a este tipo de estrés (Mao y col., 2006). Por otro lado, Sridha y Wu (2006) demostraron que la histona deacetilasa H2DC modula la expresión de genes de respuesta al ABA y a distintos estreses abióticos.

Por otro lado, la respuesta a diferentes tipos de estreses bióticos también está relacionada con los niveles de acetilación de las histonas. Por ejemplo, la histona deacetilasa 19 (HDA19) podría regular la expresión de los genes involucrados en la señalización del etileno y del ácido jasmónico en respuesta a patógenos en *Arabidopsis* (Zhou y col., 2005).

Por último, existen evidencias de que en plantas los complejos remodeladores de la cromatina juegan un papel importante en la reparación del daño en el ADN causado por la radiación UV-B. Análisis transcriptómicos utilizando variedades de maíz con distinta sensibilidad al UV-B mostraron una mayor inducción en la expresión de genes que codifican para factores remodeladores de la cromatina en las plantas que presentan mayor tolerancia al UV-B (Casati y col., 2006). Por otro lado, en estudios recientes se ha puesto en evidencia la importancia de la acetilación de las histonas en la reparación del ADN luego de la exposición al UV-B. Plantas de maíz tratadas con curcumina (un inhibidor de histonas acetiltransferasas) presentaron deficiencias en la reparación del daño en el ADN por UV-B. Además, plantas de *Arabidopsis* deficientes en la expresión de *HAM1* y *HAM2*, 2 genes que codifican histonas acetiltransferasas de la familia MYST, mostraron un mayor daño

en el ADN después del tratamiento con UV-B que las plantas salvajes, lo que sugiere que estas proteínas tienen un rol importante en la reparación del ADN (Campi y col., 2012). Sin embargo, los roles de los miembros de las otras familias de histonas acetiltransferasas en respuesta a la radiación UV-B es aún desconocido. Por esta razón, y debido a que se ha reportado que algunas histonas acetiltransferasas se encuentran involucradas en diferentes procesos celulares, es que nos propusimos estudiar el rol de estas proteínas en respuesta a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*, para identificar mecanismos que participen en la adaptación y/o resistencia a esta radiación.

2.2 Objetivos:

2.2.1 Objetivo general:

Estudiar el rol de proteínas que participan en la acetilación de histonas en respuestas a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana* para identificar mecanismos que participen en la adaptación y/o resistencia a esta radiación.

2.2.2 Objetivos particulares:

1- Estudiar la regulación de histona acetiltransferasas (HACs) de *Arabidopsis thaliana* por UV-B.

2- Analizar diversas respuestas fenotípicas de plantas salvajes de *Arabidopsis* frente al tratamiento con UV-B y comparar dichas respuestas con las de plantas con niveles nulos o disminuidos en la expresión de distintas HACs.

3- Estudiar el rol de distintas HACs en procesos tales como la reparación del ADN y la regulación de la expresión génica luego del tratamiento con UV-B en *Arabidopsis*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material vegetal - líneas utilizadas

Se utilizaron semillas de 20 líneas diferentes de *Arabidopsis thaliana* que se describen a continuación:

- Una línea salvaje que corresponde al ecotipo Columbia (Col0).
- Una línea salvaje que corresponde al ecotipo Wassilewskija (Ws)
- Una línea transgénica que posee una disminución en los niveles de los transcritos de *HAG1*, por silenciamiento a través de ARN de interferencia (ARNi), CS30928. Dicha línea posee un genotipo correspondiente al ecotipo Ws y en este trabajo se denominó *hag1*.
- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAG2, SALK_051832C y SALK_152796C, denominadas en este trabajo como *hag2-1* y *hag2-2* respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.
- Una línea transgénica que posee una disminución en los niveles de los transcritos de *HAG3*, por silenciamiento a través de ARN de interferencia (ARNi), CS3981. Dicha línea posee un genotipo correspondiente al ecotipo Ws y en este trabajo se denominó *hag3*.
- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAC1, SALK_082118C y SALK_080380C, denominadas en este trabajo como *hac1-1* y *hac1-3* respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.
- Dos líneas transgénicas que poseen una disminución en los niveles de los transcritos de *HAC2*, por silenciamiento a través de ARN de interferencia (ARNi), CS30854 y CS30855. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Ws y en este trabajo se denominaron *hac2-2* y *hac2-3*, respectivamente.
- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAC4, SALK_051750C y SALK_045791C, denominadas en este trabajo como *hac4-1* y *hac4-4* respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.
- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAC5, SALK_152684C y SALK_122443C, denominadas en este trabajo como *hac5-7* y *hac5-8*

respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.

- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAC12, SALK_012469C y SALK_071102C, denominadas en este trabajo como *hac12-2* y *hac12-3* respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.
- Una línea que presenta una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAF1, SALK_110848C, denominada en este trabajo como *haf1-3*. Dicha línea posee un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.
- Una línea transgénica que posee una disminución en los niveles de los transcritos de *HAF1*, por silenciamiento a través de ARN de interferencia (ARNi), CS30866. Dicha línea posee un genotipo correspondiente al ecotipo Ws y en este trabajo se denominó *haf1-4*.
- Dos líneas que presentan una mutación insercional por ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen que codifica para la proteína HAF2, SALK_110029 y SALK_038282C, denominadas en este trabajo como *haf2-3* y *haf2-4* respectivamente. Dichas líneas poseen un genotipo correspondiente al ecotipo Col0.

Las líneas mutantes por inserción de ADN-T se obtuvieron del “Arabidopsis Biological Resource Center” (ABRC, <https://abrc.osu.edu/>), que recopila, preserva, reproduce y distribuye diversas semillas de *Arabidopsis thaliana* y especies relacionadas.

Las plantas transgénicas con disminución en los niveles de proteínas por expresión de un ARN de interferencia (ARNi) obtenidas del Plant Chromatin Functional Genomics Consortium (<http://www.chromdb.org/>).

2.3.2 Condiciones de cultivo

Las semillas se sembraron en vasos o bandejas plásticas conteniendo tierra humedecida y esterilizada previamente. Dichos vasos y bandejas se cubrieron con un film, se incubaron 48 h a 4°C en oscuridad y luego se trasladaron a la cámara de cultivo bajo luz blanca en ausencia de radiación UV-B, en condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad controladas ($250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 23°C y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad). Las plantas se regaron diariamente.

Por otro lado, para los experimentos de medida de la longitud de raíz primaria y de liberación de electrolitos, se sembraron semillas en placas de Petri conteniendo

medio MS (Moorashige y Skoog) en condiciones de esterilidad, luego fueron incubadas 48 h a 4°C en oscuridad y finalmente trasladadas a la cámara de cultivo bajo luz blanca en condiciones controladas.

2.3.3 Tratamientos con UV-B

Para el tratamiento de las plantas con radiación UV-B, se emplearon lámparas que emiten dicha radiación (Bio-Rad) a una intensidad de 2 o 4 W.m⁻² de UV-B y 0,6 W.m⁻² de UV-A durante 4 o 1 h dependiendo del experimento, colocadas por encima de las plantas a una distancia de aproximadamente 30 cm. Se utilizaron filtros de acetato de celulosa para excluir longitudes de onda menores a 280 nm, entre las que se encuentra la radiación UV-C.

En el caso de los controles correspondientes al tratamiento en ausencia de UV-B (tratamiento control), además de utilizarse los filtros de acetato de celulosa, se utilizaron filtros plásticos de poliéster (plástico de poliéster claro de 100 µm), el cual absorbe la radiación UV-B sin disminuir significativamente las radiaciones UV-A o visible (0,05 W.m⁻² de UV-B, 0,4 W.m⁻² de UV-A). Las plantas controles se expusieron durante el mismo período de tiempo y fueron sometidas a las mismas condiciones que las plantas irradiadas con UV-B. La radiación suministrada en cada uno de los tratamientos en todos los experimentos fue registrada usando un detector de radiación UV-A y UV-B (Ultraviolet Radiometer Modelo UV203, Macam Photometrics Ltd.).

2.3.4 Purificación de ácidos nucleicos

2.3.4.1 Extracción de ADN genómico

100 mg de hojas fueron pulverizados en un tubo de microcentrífuga con nitrógeno líquido. A continuación se agregaron 300 µl de buffer de extracción (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 3% (P/V) bromuro de cetiltrimetilamonio) y se incubó la mezcla a 60°C durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 300 µl de cloroformo invirtiendo suavemente durante 1 min. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 13300 rpm y la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo. Luego, el ADN se precipitó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol, incubándose a -20°C durante al menos 20 min. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación durante 10 min a 13300 rpm y se lavó con 500 µl de etanol al 70% (V/V). A continuación se centrifugó durante 10 min a 13300 rpm y se descartó el sobrenadante. El ADN precipitado se secó al vacío; y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua destilada, mezclando suavemente hasta su resuspensión total, incubándose durante 15 min a 60°C para favorecer la disolución. Los extractos de ADN genómico obtenidos fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

La calidad del ADN obtenido fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V) teñidos con SYBR Safe (Invitrogen).

2.3.4.2 Extracción de ARN

Se extrajo ARN total a partir de hojas de plantas de Arabidopsis utilizando el reactivo Quick-zol (Kalium Technologies). El material procesado se recolectó luego del tratamiento con UV-B. La muestra (fresca o almacenada a -80°C) se disgregó con un pilón hasta la formación de un fino polvo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con nitrógeno líquido. Luego se adicionaron 1000 µl del reactivo Quick-zol (Kalium Technologies) y el homogenado se dejó 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 8.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 300 µl de cloroformo, y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Luego se incubaron las muestras 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 min a 8000 rpm a 4°C. La fase superior obtenida se transfirió a un nuevo tubo, en el cual se procedió a precipitar el ARN adicionando 400 µl de isopropanol e invirtiendo el tubo con suavidad. Posteriormente se incubó 1 h a -20°C y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y el sedimento viscoso de ARN precipitado en el fondo del tubo se lavó con 800 µl de etanol 75% (V/V), se mezcló y luego se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el ARN sedimentado se secó en estufa a 37°C, y finalmente se disolvió en 20 µl de agua destilada estéril libre de ARNasas tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Por último se llevó a cabo una incubación a 60°C para favorecer la disolución. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La calidad de los ARNs obtenidos fue verificada mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa 1% (P/V) teñidos con SYBR Safe.

2.3.5 Electroforesis en geles de agarosa

El ADN genómico, los productos obtenidos por PCR y el ARN fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (1% (P/V) o 2% (P/V)) según el tamaño esperado del fragmento a resolver, empleando sistemas de tipo submarino (Sambrook y col., 1989). Se utilizó el buffer TBE 0,5x (45 mM Tris-HCl, pH 8,0; 45 mM ácido bórico; 1 mM EDTA) para la preparación de los geles y como solución de electroforesis. Para observar la resolución de las bandas se agregó SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) en una concentración final de 1x antes de la solidificación del gel de agarosa. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,25 % (P/V) azul de bromofenol, 0,25 % (P/V) xilencianol, y 30 % (V/V) glicerol, en una proporción 5:1 de volumen de

muestra: solución de siembra. En paralelo, se sembraron 5 µl de los marcadores de 50 o 100 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos), según corresponda. Los geles fueron corridos a 50-100 V. Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se visualizaron utilizando un transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo EpiChem3, UVP Bioimaging Systems).

2.3.6 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se utilizó el sistema Quanti-IT DNA HS assay Kit (Invitrogen) para la cuantificación del ADN, o el sistema Quanti-IT RNA assay kit (Invitrogen) para la cuantificación del ARN.

2.3.7 Tratamiento con ADNasa I y retrotranscripción

El tratamiento del ARN obtenido con ADNasa I se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). Se incubaron 2 µg de ARN total con 2 U de la enzima RQ1 ADNasa I durante 30 min a 37°C, en un buffer de reacción 1x (suministrado por el fabricante de la enzima). La enzima se inactivó con el agregado de 1 µl de solución Stop provista por el fabricante, incubando a 65°C durante 10 min.

La reacción de síntesis de la primera hebra de ADNc se desarrolló en un volumen final de 20 µl. Se incubaron 10 µl de ARN total tratado con ADNasa I con 1 µl de oligo dT (2 µg.µL⁻¹), 1 µl de dNTPs (25 mM), 4 µl de buffer 5x (suministrado por el fabricante de la enzima), 2 µl de DTT 0,1 M y 0,5 µl (100 U) de la transcriptasa reversa Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla a 42°C durante 2 h y luego se inactivó la transcriptasa reversa incubando los tubos durante 10 min a 65°C. Los controles negativos de la retrotranscripción se realizaron sin incluir la transcriptasa reversa en la mezcla de reacción, bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las muestras se almacenaron en un freezer a -20°C hasta su utilización.

2.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, utilizando la enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen). El medio de reacción contenía buffer 1x (provisto por el fabricante), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,25 µM oligonucleótidos cebadores y 0,625 U de ADN polimerasa. Como molde se utilizó 2 µl de ADNc, según corresponda. Las amplificaciones se realizaron utilizando alternativamente alguno de los termocicladores disponibles en el laboratorio (MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) y Px2 Thermal Cycler (Thermo). Los protocolos utilizados comenzaron con una etapa de desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguidos de 30-35 ciclos

de PCR cuyas etapas fueron definidas según el tipo de ADN molde y cebadores utilizados. Para todos los casos, la temperatura de la etapa de elongación fue de 72°C. La etapa de extensión final fue de 5 min a 72°C.

Los productos se analizaron por electroforesis en geles al 2% (P/V) de agarosa teñidos con SYBR Safe y utilizando marcadores de 50 pb.

2.3.9 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron alternativamente en un termociclador con sistema StepOne (Applied Biosystems), utilizando las herramientas del programa StepOne and StepOne Plus Software v2.3 (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl, y cada muestra se analizó por triplicado. Para la amplificación se utilizaron 50 ng ADNc, 3 mM MgCl₂, 1x buffer libre de Mg (proporcionado por el fabricante), 200 µM dNTPs, 0,8 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0.5x SYBR Green (Molecular Probes), 0,25 µM oligonucleótido reverso y 0,25 µM oligonucleótido directo. Para asegurar que la amplificación no procede de ADN contaminante, se utilizaron los controles negativos de la retrotranscripción como control de la PCR.

El protocolo para la PCR en tiempo real fue: desnaturalización inicial: 95°C durante 2 min; amplificación: 40 ciclos de las siguientes etapas, 95°C durante 10 s, 55°C durante 15 s, 72°C durante 30 s, 80°C durante 10 s donde se realiza la lectura; elongación final: 72°C durante 5 min; curva de disociación: desde 65°C hasta 95°C (la lectura se realizó cada 0,2°C). Previo al análisis de las muestras, se realizaron los estudios de linealidad en función de la concentración de molde y se verificó que los cebadores utilizados presentaran la misma eficiencia de amplificación. El valor de C_t, también denominado punto de corte, se define como el ciclo de la reacción de la PCR en el cual se comienza a detectar un incremento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal de base. Este valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADNc presente en la muestra. Los valores de C_t se determinaron para todas las muestras y se aplicaron a la siguiente fórmula:

$$\text{expresión relativa} = 2^{-(C_t \text{ target} - C_t \text{ referencia})}$$

Donde C_t target es el C_t del gen bajo estudio y C_t referencia es el C_t del gen de referencia.

Como gen de referencia se utilizó el gen At4g23650 que codifica para una proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ (CPK3), cuya expresión no varía con el tratamiento UV-B.

Los cebadores utilizados en este trabajo de tesis se listan en la Tabla I.

	Nombre	Secuencia (5'→3')
Cebadores utilizados para la selección de las plantas homocigotas mutantes y las plantas transgénicas	<i>hac1-1 L</i>	CCGATTAGGCTGTTGCTG
	<i>hac1-1 R</i>	TTCAGGAATGCAGGGTAAAG
	<i>hac1-3 L</i>	TGAGGTGCAGCACAACCTG
	<i>hac1-3 R</i>	ATGTTGCACCCGCATAGT
	<i>hac1ARNm L</i>	AGCATGGAGTTGCAGGAG
	<i>hac1ARNm R</i>	AGGCAATTGCGAGTCTTG
	<i>hac2 L</i>	TGGTCCAATAGGGCTGAG
	<i>hac2 R</i>	TCCAGCTTTTCCATCAGG
	<i>hac4 L</i>	GCATGTCAGGCCCAATAG
	<i>hac4 R</i>	ACAGCAGCGTGTTGATGA
	<i>hac4ARNm L</i>	CCCGGACAACTTCACAG
	<i>hac4ARNm R</i>	CGTTCCCACCAAGATTGA
	<i>hac5-7 L</i>	TTTCTGATGCAACTGCTTGT
	<i>hac5-7 R</i>	CGCGAACGTCAAACTTC
	<i>hac5-8 L</i>	GGAGTCACGGCATTATGTCT
	<i>hac5-8 R</i>	CTAAGAGTACTGGCTGGCAA
	<i>hac5ARNm L</i>	TTGCCATTGACAACATTCC
	<i>hac5ARNm R</i>	GTTCTTGCTGGCAGATGG
	<i>hac12-2 L</i>	CAAAATCCCCAAATCGAAG
	<i>hac12-2 R</i>	CACCTAGCACCGTCAAGTG
	<i>hac12-3 L</i>	CAATTGCGAGTCTTGCAGGT
	<i>hac12-3 R</i>	AGAGATTACCCGCATCGAGG
	<i>hac12ARNm L</i>	TGCCGTTCTCCAGTTTGT
	<i>hac12ARNm R</i>	CACTCGGATTCCTTGCAG
	<i>haf1-3 F</i>	GCTTCTGACGTTTCGACCTC
	<i>haf1-3 R</i>	GGTTTTCAAGGCGAGCAGAG
	<i>haf1 ARNm L</i>	GCGTTCCAAGATGTTTGC
	<i>haf1 ARNm R</i>	AACTGCAACCCGAAATTG
	<i>haf2-2 F</i>	GATACACATAGGCCATCATTCTGT
	<i>haf2-2 R</i>	GTCAGTCATCTGTTGAAACAAACA
	<i>haf2-3 L</i>	GAAAGGATCCGTCCTTGG
	<i>haf2-3 R</i>	TGAGGGCTTCAAATCTGG
	<i>haf2 ARNm L</i>	ATGGGAGCAATGATGAAGAG
	<i>haf2 ARNm R</i>	AAAGGCTCGAGCATGTTGTT
	RPL10A L	GCTTTGGGTACTTGTGCTC
	RPL10A R	GCCAAGAACGAAGGAACA
	LB SALK	GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC

	Nombre	Secuencia (5'→3')
Cebadores utilizados en las medidas de RT-PCR en tiempo real	CPK3 C	ATCTGGAGTGCTGGTGTGAT
	CPK3 D	AATCCACGGATGATTTAGCA
	UVR2 F	GACCCGAGTGGATATGTTGG
	UVR2 R	GAGCTGTTCTTCAGCTTTCC
	HY5 F	TCCTTTTCACCAGCTTCG
	HY5 R	TTTTCCGACAGCTTCTCC
	F3H F	GGAAGAGATTTGGAGCTTGC
	F3H R	CACACCGAGCCTAGCATAAT
	UVR7 F	TACATTCGGGTCTCTTGCTC
	UVR7 R	TCCTCGTCTTCTTCAACAGG
	CHS F	TGATGGCTGGTGCTTCTT
	CHS R	GACGTTTCCGAATTGTCG
	SOC1 F	ATGAATTCGCCAGCTCCAAT
	SOC1 R	GCTTCATATTTCAAATGCTGCA
	FLC F	AGCCAAGAAGACCGAACTCA
	FLC R	CATGATGATTATTCTCCATCTG
	E2Fb L	TGCCGATGAAAGAGGAAA
	E2Fb R	GCTCGATGGAGTTTGTGG
	E2Fc L	AGATGAGTTTTCCGCAACAG
	E2Fc R	GCTCACCTCTGCATCTGACT
	E2Fe L	TCACACTGAGCAGCGATTT
	E2Fe R	TGGGTGACTTCGCTGAAC

Tabla I. Cebadores utilizados en la selección de plantas homocigotas mutantes y transgénicas y en las reacciones de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

2.3.10 *Análisis del daño en el ADN*

2.3.10.1 *Ensayo de dot blot*

El protocolo para detectar dímeros de pirimidinas por formación de anillo de ciclobutano (DPCs) se adaptó del descrito por Stapleton y Walbot (1994). Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para DPCs (CAC-NMDND001, CosmoBio Co.). Para los experimentos de dot blot, primero se extrajo el ADN de al menos seis muestras de hoja de plantas sometidas al tratamiento con UV-B o de plantas control. Luego, 2 µg de ADN obtenidos de cada muestra fueron desnaturalizados con 100 µl de NaOH 0,3 M durante 10 min y luego fueron transferidos a una membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare), que luego se horneó a 80°C durante 2 h para fijar el ADN. Luego la membrana se bloqueó con 5% (P/V) de leche descremada en polvo en buffer TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) por al menos 1 h a temperatura ambiente con agitación continua. Se realizaron tres lavados de 10 min con buffer TBS y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (1:2000 en buffer TBS), también con agitación. El anticuerpo no unido se eliminó por tres lavados de 10 min con buffer TBS, y el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, se incubó con la

membrana durante al menos 1 h a temperatura ambiente, agitando continuamente. Se hicieron nuevamente dos lavados con TBS, se equilibró la membrana con buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) por 20 min y se procedió al revelado con 15 ml de una solución conteniendo 15 µl de NBT 30 mg.ml⁻¹ y 15 µl de BCIP 15 mg.ml⁻¹ en buffer sustrato, dejando reaccionar en oscuridad hasta observar aparición de color. Para finalizar la reacción se lavó con agua destilada.

2.3.11 Densitometría de las imágenes

Las imágenes de las membranas se adquirieron utilizando el digitalizador de imágenes EpiChem3 (UVP Bioimaging Systems), y las densitometrías se realizaron usando el software Image J.

2.3.12 Cuantificación de flavonoides y antocianinas

La extracción de flavonoides totales se realizó mediante la maceración de 50 mg de muestra con N₂ líquido, seguida de una primera extracción con 0,6 ml de metanol ácido (1% (v/v) HCl en metanol), y posterior incubación durante 8 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 ml de cloroformo y 0,6 ml de agua destilada. La solución resultante se centrifugó durante 2 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente, descartándose la fase orgánica. Sobre la fase acuosa, se realizó un espectro de absorbancia comprendido entre 280 nm y 600 nm, y se midió el pico de absorbancia a 312 nm. Esta misma muestra se utilizó para la medida de antocianinas. Se midió la absorbancia a 535 nm y 650 nm y las cantidades fueron calculadas como (A₅₃₅ – A₆₅₀).g⁻¹ peso fresco (PF).

2.3.13 Ensayo de elongación de la raíz primaria

Para la medida de la inhibición de la elongación de raíz primaria por UV-B, las semillas de Arabidopsis fueron germinadas en placas de Petri conteniendo medio MS en sala de cultivo. Las placas se ubicaron en forma vertical para permitir la elongación de las raíces a lo largo de la misma. Las plántulas fueron crecidas durante 5 días, se hizo una marca en el extremo de cada raíz para registrar la longitud de las mismas, y luego se realizó un tratamiento de 1 h con UV-B a 4 W.m⁻² en las placas dispuestas de forma horizontal. Una vez finalizado el tratamiento, las placas fueron colocadas en la sala de cultivo en posición vertical, y se registró el crecimiento de las raíces a las 24, 48, 72 y 96 h del tratamiento mediante una marca en la placa. El último día (96 h) se tomó una fotografía para su posterior análisis.

La medida de la longitud de la raíz primaria fue realizada de forma digital con el software ImageJ, y el análisis estadístico con el programa Sigma Plot.

2.3.14 Medidas del área de la roseta

Las semillas se sembraron en bandejas plásticas como se detalló en la sección 2.3.2, se dejaron crecer y se realizó un tratamiento de 4 h con UV-B a 2 W.m^{-2} a los 13 días después de la germinación. Se tomaron fotografías cada 3 días, antes y después del tratamiento con UV-B. La cuantificación del área de la roseta se realizó de forma digital sobre cada fotografía tomada mediante el programa Image J. El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Plot.

2.3.15 Observación microscópica de las células del parénquima en empalizada

Las plantas de Arabidopsis de los genotipos analizados se sometieron a un tratamiento con UV-B el día en el cual la hoja #5 estaba emergiendo, luego del cual se incubaron en las condiciones de crecimiento ya indicadas hasta el fin de la expansión de la hoja #5, aproximadamente 4 semanas luego de la germinación. Se colectaron cuidadosamente las hojas de interés incluyendo el pecíolo, se las incubó al menos 24 h en una solución fijadora denominada FAA (50 % (V/V) alcohol medicinal; 5 % (V/V) ácido acético; 3,7 % (V/V) formaldehído) según se indica en Horiguchi y col. (2005). A continuación, se las incubó en agitación suave 16 h como mínimo y 48 h como máximo en una solución decolorante conteniendo hidrato de cloral, la cual se preparó calentando en agitación 50 ml de agua con 20 g de glicerol (aproximadamente 16 ml) y se adicionó 200 g de hidrato de cloral de a poco hasta lograr la completa disolución del mismo. A continuación, se montaron las hojas con la cara adaxial hacia arriba utilizando la solución decolorante como solución de montaje dada la gran viscosidad de la misma; se tomaron fotografías de las células del parénquima en empalizada utilizando un microscopio óptico (DIC, del inglés, Differential Interference Contrast) Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japón) y una cámara digital Nikon digital Sight DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón). Se tomaron seis fotografías por hoja, tres a cada lado de la nervadura central, a una distancia del 50% de la base de la hoja. Utilizando el software Image J, se determinó el área de al menos 60 células para cada hoja. Luego, se tomaron fotos de las hojas completas utilizando el digitalizador de imágenes EpiChemi3 de UVP, y se determinó el área de las mismas utilizando el software Image J. Finalmente, se calculó el número promedio de células por hoja, asumiendo que el área de la hoja es igual al área celular promedio por el número de células.

$$\text{Área de la hoja \#5} = \text{área celular promedio} \times \text{N}^{\circ} \text{ de células}$$

2.3.16 Determinación del tiempo de floración

Las semillas se sembraron en bandejas plásticas y se dejaron crecer durante 9 días después de la germinación. Luego, a partir del día 10 y durante el resto de los

días hasta la apertura del primer botón floral, un grupo de plantas fueron irradiadas con UV-B (2 W.m^{-1}) durante 1h diaria en el horario del mediodía, y otro grupo se mantuvo en condiciones control en ausencia de UV-B. En estas plantas se contaron las hojas de la roseta y los días transcurridos desde la germinación hasta la aparición del primer botón floral.

2.3.17 Determinación de parámetros de daño oxidativo

2.3.17.1 Liberación de electrolitos

Para la determinación de la liberación de electrolitos se utilizaron 6 plantas de Arabidopsis de 14 días por réplica. Para ello, hojas de plantas salvajes y mutantes se colocaron en cajas de plástico con pocillos de 3 cm de diámetro conteniendo agua destilada. Un grupo de hojas fue irradiadas a una intensidad de 2 W.m^{-2} de UV-B y a una intensidad de UV-A de $0,6 \text{ W.m}^{-2}$ por 4 h, mientras que otro se utilizó como control y no recibió UV-B. El daño oxidativo fue estimado a través de la determinación de la pérdida de electrolitos al medio de incubación. La conductividad de la solución fue medida con un conductímetro Horiba B-173 al inicio del tratamiento y al finalizar el mismo. Para evaluar la cantidad total de electrolitos presente en el tejido, el mismo fue autoclavado junto con el líquido y luego de alcanzar la temperatura ambiente se midió la conductividad resultante. Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje de electrolitos liberados en el tratamiento con respecto al total presente en el tejido (conductividad inicial/conductividad total x 100).

2.3.17.2 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para ensayar los productos finales formados por la peroxidación de lípidos, entre ellos el malondialdehído (MDA), se utilizó la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). De esta manera, hojas de plantas salvajes y mutantes de Arabidopsis fueron pulverizadas con un pilón en un tubo de microcentrifuga con N_2 líquido, y se realizó un extracto crudo con 6 volúmenes de buffer de extracción de proteínas (50 mM de fosfato de potasio, 1mM de EDTA, 15% (V/V) de glicerol, 5mM de ascorbato, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2% (P/V) de polivinilpolipirrolidona). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se incubó durante 1 h a 4°C con 1 volumen de TCA 10% (P/V) para precipitar las proteínas. Luego de centrifugar la solución a 10000 rpm durante 20 min se incubaron iguales volúmenes del sobrenadante con TBA (0,5% (P/V) en 20% (P/V) TCA) y 0.1% (P/V) de butilhidroxitolueno (4% (P/V) disuelto en etanol) a 95°C durante 45 min. Posteriormente, la solución fue enfriada en hielo y se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue colectado en un nuevo tubo y se midió la absorbancia a 532 y 600 nm en un lector de microplacas EPOCH 2 Microplate Reader (Biotek). El valor de absorbancia a 600 nm fue

descontado de la absorbancia medida a 532 nm. El coeficiente de extinción del MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) fue utilizado para los cálculos del contenido de TBARS en las muestras. Los resultados fueron expresados en nanomoles por g de peso fresco ($\text{nmol} \cdot \text{gPF}^{-1}$).

2.3.17.3 Determinación cualitativa de los niveles del anión superóxido: Tinción con NBT

Plantas de Arabidopsis crecidas en las condiciones indicadas en la sección 2.3.2 se trataron con UV-B a los 15 días posteriores a la germinación. Luego de finalizado el tratamiento, se recolectaron las plantas enteras, se lavaron con agua, se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml con una solución $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de NBT disuelto en 25 mM de Hepes (pH 7,6) y se infiltraron aplicando vacío durante 2 seg a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a cambiar dicha solución por una de etanol 80% (v/v) y se incubó toda la noche, en oscuridad y con agitación suave. Por último, las plantas se lavaron con agua y se fotografiaron.

2.3.18 Determinación de los niveles de ploidía a través de la técnica de citometría de flujo.

Plantas de Arabidopsis crecidas en las condiciones indicadas en la sección 2.3.2 se sometieron a un tratamiento con radiación UV-B al momento en que la hoja #5 estaba emergiendo y luego se incubaron nuevamente en la cámara de cultivo en ausencia de UV-B hasta el fin de la expansión de la hoja #5. Se colectaron cuidadosamente 10 hojas #5 y se colocaron en el centro de una placa de Petri de 3,5 cm de diámetro. Luego se agregó 1 ml de buffer de extracción de núcleos (buffer Galbraith: 45 mM MgCl_2 , 20 mM ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico (MOPS), 30 mM de citrato de sodio, 0.1% (V/V) de Tritón X-100, ajustado a pH 7 con 1M de NaOH, filtrado a través de un filtro de 0,22 μm y almacenado a -20°C en alícuotas de 10 ml), se hicieron alrededor de 15 cortes transversales en las hojas con una cuchilla bien afilada y se homogenizó el extracto pipeteando varias veces. El homogenado fue filtrado en una malla de 40 μm y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. 300 μl fueron transferidos a un nuevo tubo, al cual se le agregaron 15 μl de una solución de ARNasa (dilución 1/10) para alcanzar una concentración final de $50 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$. Posteriormente, el extracto se incubó 10 minutos en hielo y se agregaron 15 μl de IP (concentración final $50 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$). Por último, las muestras se incubaron en hielo y en oscuridad desde unos minutos hasta una hora antes de realizar el análisis.

Las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo Cell Sorter BD FACSAria II, a baja velocidad registrando al menos 5.000 eventos para obtener datos estadísticamente confiables.

Para determinar el índice de endorreduplicación o IE de cada planta en una condición determinada se utilizó la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{[(0 \times 2C) + (1 \times 4C) + (2 \times 8C) + (3 \times 16C) + (4 \times 32C)]}{100}$$

2.3.19 Análisis estadístico

El grado de significancia de las diferencias analizadas en los distintos experimentos fue obtenido mediante la utilización de las pruebas ANOVA y t de Student. El análisis se realizó en base a una confianza del 95%, es decir, con un valor de p menor a 0,05.

2.4 Resultados

2.4.1 *Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia GNAT en las respuestas a la radiación UV-B*

La familia GNAT de histonas acetiltransferasas comprende tres subfamilias en eucariotas superiores, denominadas GCN5 (del inglés “general control non-derepressible protein5”), ELP3 (una proteína perteneciente al complejo Elongator) y HAT1, agrupadas por su similitud de secuencia y en los motivos relacionados a la acetilación (Sternier y Berger, 2000). *Arabidopsis* posee en su genoma tres genes que codifican proteínas de esta familia: HAG1/AtGCN5, HAG2 y HAG3, homólogas a GCN5, HAT1 y a ELP3 de humanos, respectivamente (Pandey y col., 2002).

Las proteínas HAG1, HAG2 y HAG3 presentan entre sí un porcentaje bajo de similitud de secuencia de aminoácidos (14-19%, Tabla II). Poseen un dominio HAT comprendido por cuatro dominios A-D (dominio GNAT) (Sternier y Berger, 2000) y además, HAG1 posee un bromodominio (BRD) mientras que HAG3 presenta un dominio de unión a S-adenosilmetionina (Radical SAM) (Figura 7). Los bromodominios fueron encontrados en proteínas de unión a ADN en mamíferos, invertebrados y levaduras (Haynes y col., 1992). Los mismos están involucrados en la interacción proteína-proteína y pueden interaccionar con lisinas acetiladas (Jeanmougin y col., 1997). Las tres proteínas HAG tienen la capacidad de acetilar histonas pero en diferentes residuos de lisina; por ejemplo HAG1 acetila específicamente H3K14 (Earley y col., 2007), HAG2 acetila H4K12 (Earley y col., 2006), mientras que las mutantes *hag3* mostraron deficiencia en la acetilación en H3K56 y H4K5 (Xu y col., 2012). Por otra parte, bases de datos de microarreglos de *Arabidopsis* muestran que los genes *HAG* tienen diferente patrón de expresión; si bien los tres genes se expresan en hojas, *HAG1* y *HAG2* se expresan mayoritariamente en flores en estadio temprano y *HAG3* se expresa mayoritariamente en semillas (Figura 8). Además, se ha demostrado que las tres proteínas participan en diferentes procesos durante el ciclo de la vida de las plantas.

	HAG3	HAG1	HAG2
HAG3	100%	17,34%	14,18%
HAG1	17,34%	100%	19,02%
HAG2	14,81%	19,02%	100%

Tabla II: Porcentajes de similitud de secuencia de las proteína HAG1, HAG2 y HAG3.

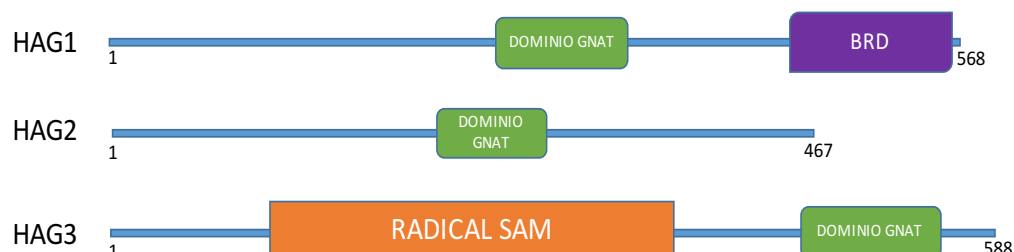


Figura 7: Representación esquemática de la organización de los dominios de las proteínas GNAT en *Arabidopsis*. Los diferentes dominios están representados con distintos colores y se muestra la localización relativa dentro de la secuencia de la proteína. Adaptado de la base de datos Pfam.

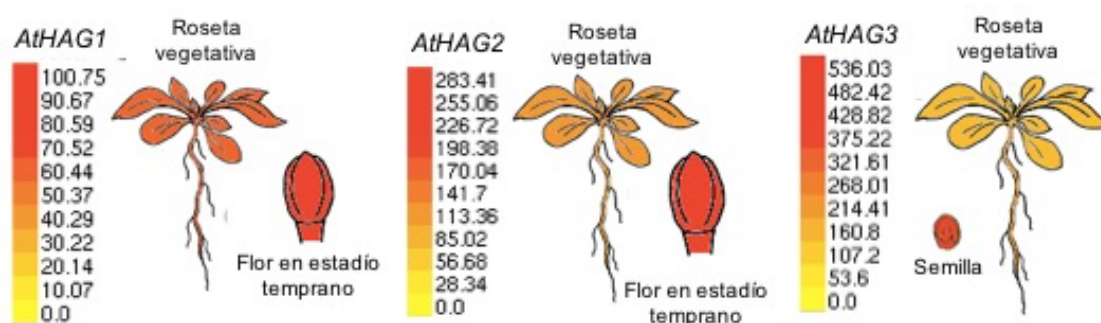


Figura 8: Patrón de expresión de los genes HAG1, HAG2 y HAG3 en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de EFPBrowser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

La proteína HAG1 posee un rol durante el desarrollo de las plantas y en la regulación de la expresión de genes involucrados en estrés por frío y luz (Servet y col., 2010). Por otro lado, HAG3 es una subunidad del complejo Elongator (Nelissen y col., 2003, 2005). Dicho complejo fue identificado por primera vez en levaduras, como un complejo proteico asociado a la RNA polimerasa II (RNAP II) (Otero y col., 1999) y luego se demostró que el mismo es altamente conservado en organismos eucariotas (Nelissen y col., 2003; Versées y col., 2010). La presencia de la histona acetiltransferasa ELP3 en el complejo y la copurificación con la RNAP II sugieren que Elongator facilita la elongación de la transcripción a través de la acetilación de las histonas (Otero y col., 1999). En *Arabidopsis*, el complejo está compuesto por un subcomplejo de 3 subunidades formado por las proteínas ELP1, ELP2 y ELP3, y un subcomplejo accesorio formado por ELP4, ELP5 y ELP6 (Krogan y Greenblatt, 2001; Sebastiaan Winkler y col., 2001). Se ha observado que la mutación en los genes que

codifican a alguna de las 6 subunidades del complejo presentan un fenotipo similar, sugiriendo que todas las subunidades son requeridas para la función del complejo (Krogan and Greenblatt, 2001; Nelissen y col., 2005). Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos muestran que los genes que codifican para cada una de las 6 subunidades del complejo Elongator de levaduras posee un gen homólogo en el genoma de *Arabidopsis* (Nelissen y col., 2003). Las plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* en distintas subunidades del complejo muestran hojas estrechas y alargadas, menor longitud de la raíz primaria y menor densidad de raíces laterales (Nelissen y col., 2005, 2010), como así también hipersensibilidad a la hormona ABA, resistencia al estrés oxidativo y sequía, susceptibilidad a enfermedades y alteraciones en la progresión del ciclo celular (Nelissen y col., 2005; Chen y col., 2006; Zhou y col., 2009), demostrando que Elongator juega un rol importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, se ha observado que los niveles de etileno, jasmonato y la expresión de algunos genes involucrados en la respuesta a estrés abiótico se encuentran aumentados en las plantas mutantes, lo que podría contribuir a los fenotipos pleiotrópicos observados (Chen y col., 2006; Zhou y col., 2009).

Por último, a pesar de que poco se conoce sobre el rol de HAG2 *in vivo*, la expresión de HAG2 se encuentra regulada por los factores de transcripción de la familia E2F, los cuales regulan la transcripción de genes requeridos para la progresión del ciclo celular y la replicación del ADN (Vandepoele y col., 2005).

2.4.1.1 Regulación de la expresión de las histonas acetiltransferasas de la familia GNAT por la radiación UV-B

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que HAM1 y HAM2, dos genes que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia MYST en *Arabidopsis*, son inducidos por la radiación UV-B (Campi y col., 2012). De esta manera, se analizó si la expresión de genes que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia GNAT es regulada por UV-B en plantas salvajes de *Arabidopsis*. Para llevar a cabo dicho objetivo, mediante RT-PCR cuantitativa se determinaron los niveles de transcritos de los genes en estudio en hojas de *Arabidopsis* Col0, luego de un tratamiento con UV-B durante 4 h y en condiciones control en ausencia de UV-B, como se describió en la sección Materiales y Métodos. La Figura 9 muestra que no hay cambios significativos en los niveles de expresión de los genes HAG1, HAG2 y HAG3 en plantas salvajes en condiciones control con respecto a los niveles en las plantas que fueron expuestas al UV-B.

2.4.1.2 Identificación de plantas de *A. thaliana* deficientes en los genes de la familia GNAT

Para realizar el trabajo experimental se utilizaron plantas de *Arabidopsis* que presentan una supresión o disminución en la expresión de las 3 histonas

acetiltransferasas. Para ello se utilizaron, por un lado, plantas transgénicas con disminución en los niveles de transcritos por expresión de un ARN de interferencia (ARNi) para los genes *HAG1* y *HAG3* y por otro lado, se utilizaron plantas mutantes por inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen *HAG2* descritas en la sección Materiales y Métodos.

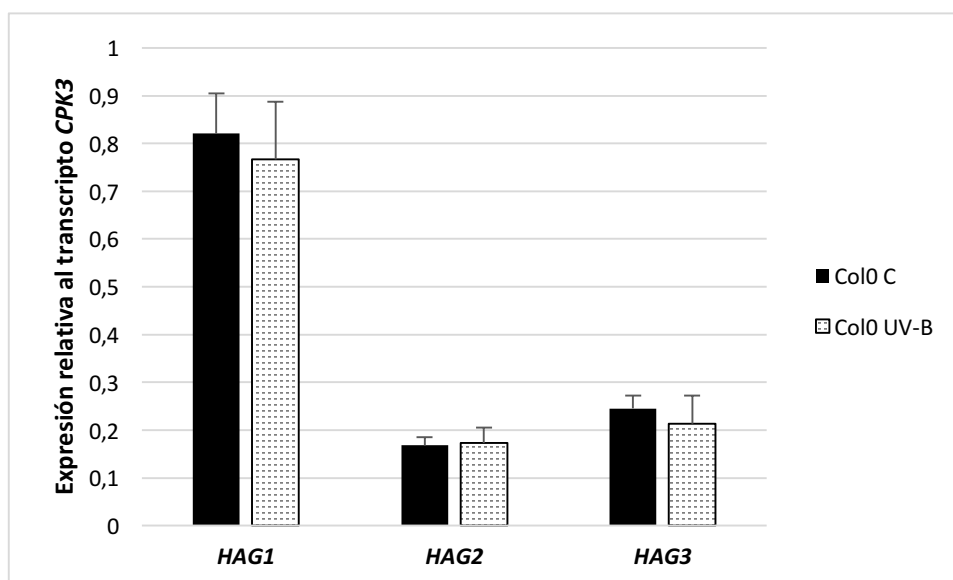


Figura 9: Niveles de expresión de los genes que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia GNAT. Los niveles de los transcritos *HAG1*, *HAG2* y *HAG3* se midieron en plantas de *Arabidopsis* Col0 en condiciones control en ausencia de UV-B y luego de la exposición con radiación UV-B por 4h. Las barras de error corresponden a los errores estándar. Para la normalización de los datos se utilizó el transcrito del gen *CPK3*.

2.4.1.2.1 Selección de plantas mutantes homocigotas por inserción de ADN-T

Las semillas se sembraron en bandejas plásticas y se utilizó una hoja de las mismas para la extracción del ADN genómico. El ADN se utilizó como molde para el análisis por PCR de la inserción del ADN-T y la búsqueda de plantas homocigotas para la mutación. El diseño experimental se basa en que las plantas que poseen insertado el ADN-T, a diferencia de las plantas salvajes, presentan una reacción de amplificación negativa cuando se utilizan cebadores que flanquean la región de inserción del ADN-T, y una reacción de amplificación positiva cuando se utiliza un cebador que hibrida en un extremo del ADN-T y otro en la secuencia del gen. A modo de ejemplo, en la Figura 10 se observa que las plantas 2 y 3 (calles 2 y 3) de la línea *hag2-1* contienen la inserción del ADN-T en ambos alelos del gen *HAG2* ya que no presentan un producto de amplificación utilizando el par de cebadores HAG2-1L-HAG2-1R (cebadores que flanquean la región de inserción del ADN-T) (Figura 10b) y muestran un producto de amplificación utilizando un cebador que hibrida en un extremo del ADN-T (LB SALK) y otro en la secuencia del gen *HAG2* (HAG2-1L) (Figura 10c), de esta manera estas plantas son homocigotas mutantes en *HAG2*.

Además, en la Figura 10b se puede observar que la planta salvaje Col0 (calle 9, WT) muestra un producto de PCR con los oligonucleótidos HAG2-1L- HAG2-1R mientras que no muestra un producto de amplificación utilizando los cebadores LB SALK-HAG2-1L, debido a que el ADN-T no se encuentra insertado en esa región. Una vez identificadas las plantas mutantes homocigotas, se analizó la expresión de los genes correspondientes mediante RT-PCR para verificar que la expresión del gen en estudio en estas plantas mutantes sea nula o se encuentre disminuida. A modo de ejemplo, en la Figura 10d se muestra que no se detecta el transcripto *HAG2* en las calles 2 y 3; correspondientes a plantas mutantes *hag2* homocigotas.

2.4.1.2.2 Selección de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas utilizadas fueron generadas por transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* con un vector binario que contiene un fragmento del gen que se quiere silenciar en una disposición de repetición invertida para silenciamiento por ARNi. Además, posee un gen de resistencia al herbicida BASTA. Así, las plantas transgénicas se seleccionaron en base a esta resistencia y como control se utilizaron plantas salvajes Ws (background genético de las plantas transgénicas utilizadas), las cuales detuvieron su crecimiento luego del tratamiento con el herbicida, debido a que no poseen resistencia. Además, los niveles de expresión de cada uno de los genes de interés se midieron por RT-PCR en tiempo real en las plantas resistentes para verificar que los niveles de transcriptos se encuentren disminuidos en comparación al medido en plantas salvajes. A modo de ejemplo, en la Figura 11 se observa que las plantas transgénicas *hag1* y *hag3* poseen niveles disminuidos de los transcriptos *HAG1* y *HAG3* en comparación con los niveles medidos en plantas salvajes Ws.

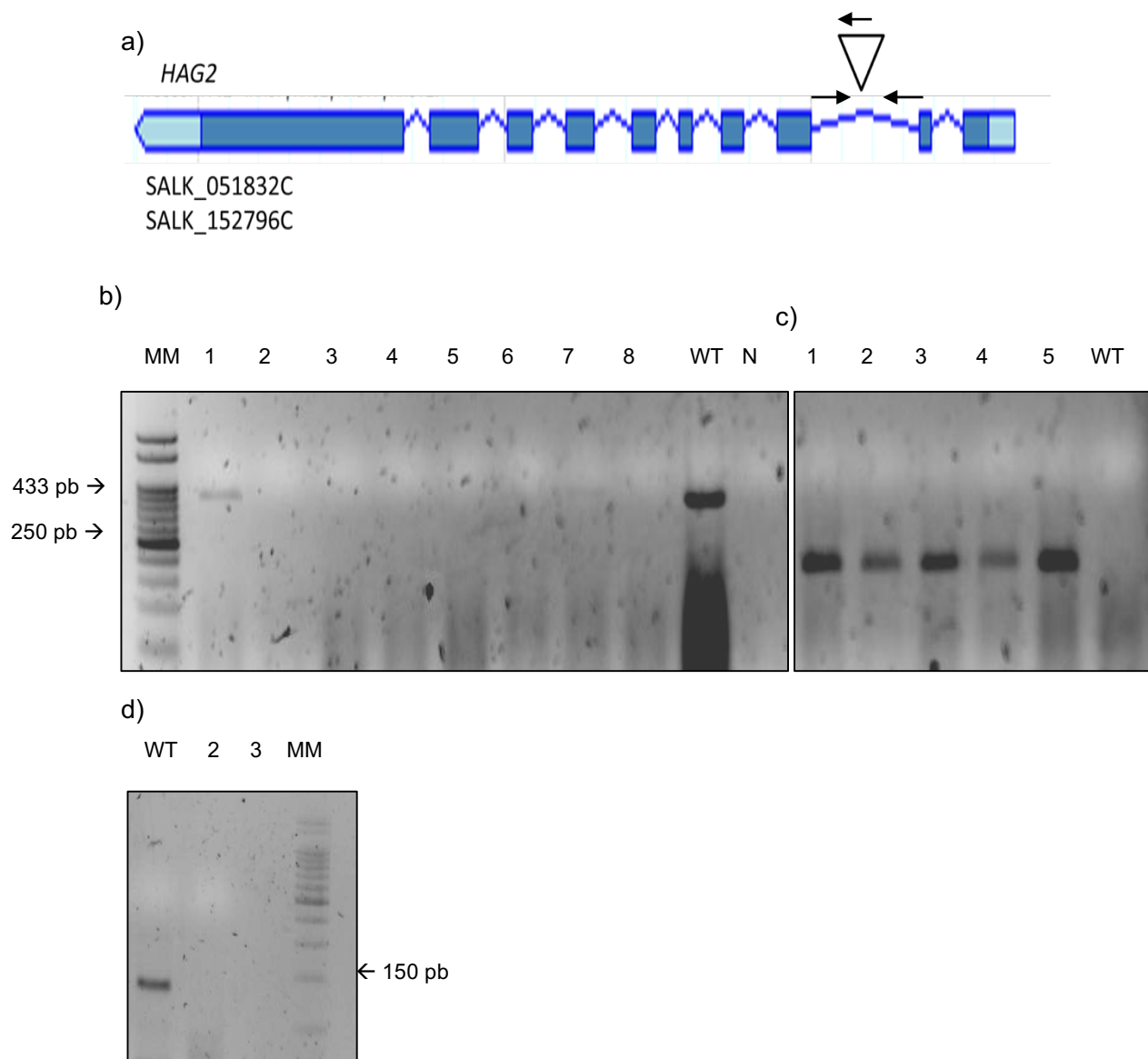


Figura 10. Identificación de plantas *Arabidopsis* mutantes homocigotas *hag2-1*. (a) Esquema del gen *HAG2* de *A. thaliana*. Los exones se encuentran representados por recuadros azules; los intrones, por líneas azules; y las regiones UTR, por recuadros celestes. El sitio de inserción del ADN-T se indica con un triángulo invertido. (b-d) Análisis de los productos de PCR separados en un gel de agarosa 1% (p/v). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando ADN genómico de 8 plantas con los cebadores HAG2-1L-HAG2-1R (b), y de 5 plantas utilizando los cebadores LB SALK – HAG2-1L (c). (D) RT-PCR utilizando ADNc de 2 plantas homocigotas *hag2-1* y los cebadores HAG2-1ARNm L-HAG2-1ARNm R. MM, marcadores de masa molecular; WT, reacciones de PCR realizadas utilizando una muestra de una planta salvaje; N, control negativo de la PCR (sin el agregado de ADN genómico). Los números de las calles indican las plantas analizadas.

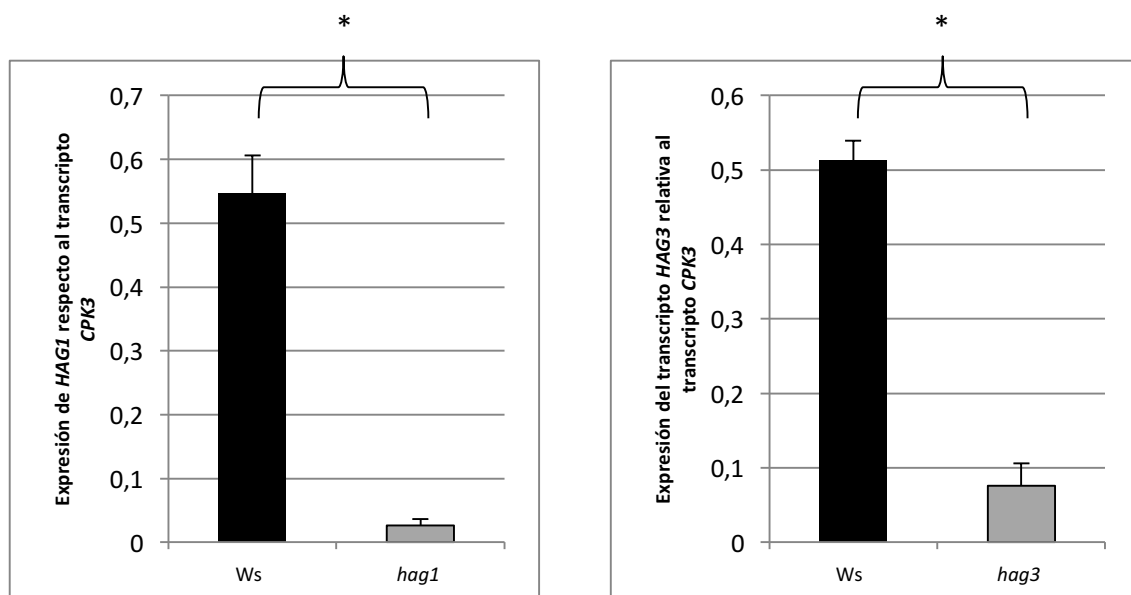


Figura 11. Niveles de los transcritos HAG1 y HAG3 en plantas transgénicas por ARNi y en plantas salvajes. Expresión relativa a *CPK3* de *HAG1* y *HAG3* en plantas transgénicas (a) *hag1*, (b) *hag3* y en plantas salvajes Ws. Las barras de error corresponden al error estándar. El asterisco indica diferencias significativas entre las líneas, analizadas mediante t de student con un $p < 0,05$.

2.4.1.3 Caracterización fenotípica de plantas deficientes en la expresión de histonas acetiltransferasas expuestas a la radiación UV-B

2.4.1.3.1 Efecto de la radiación UV-B sobre el área de la roseta

Previamente, en nuestro laboratorio demostramos que plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a la radiación UV-B durante 4 h a una intensidad de 2 W.m^{-2} muestran una inhibición del crecimiento de las hojas, y esta disminución en el tamaño de las hojas es consecuencia de la inhibición de la división celular (Casadevall y col., 2013). Por ello, analizamos el efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de las hojas de plantas mutantes y transgénicas con disminución en la expresión de los genes de la familia GNAT y lo comparamos con el crecimiento de las hojas de plantas salvajes.

Para llevar a cabo dicho objetivo, se analizó el crecimiento de la roseta de plantas salvajes y mutantes o transgénicas de 14 días, expuestas a un tratamiento con radiación UV-B de 2 W.m^{-2} de intensidad durante un período de 4 h. Para evaluar el efecto de la radiación sobre el crecimiento de las plantas se tomaron fotos cada 3 días luego de la germinación de las plantas y se calculó el área de las mismas con el Software Image J.

Los resultados presentados en la Figura 12 muestran que todas las plantas presentaron un menor área de la roseta luego del tratamiento con UV-B. Por otro lado, observamos que en condiciones control el área de las rosetas de las plantas *hag1*, *hag2-1*, *hag2-2* y *hag3* es menor que el de las plantas salvajes, demostrando que

estas tres proteínas tienen un rol en el crecimiento de las plantas, como fue previamente reportado (Nelissen y col., 2005; Servet y col., 2010). Luego del tratamiento con UV-B, las plantas *hag1*, *hag2-1* y *hag2-2* presentaron un área de la roseta menor que el de las plantas salvajes; mientras que las plantas *hag3*, mostraron una roseta de área similar al de las plantas salvajes (Figura 12a, b y c). Las Figuras 12d y 12e muestran que las plantas *hag1-2* y *hag2-1* presentan una inhibición del crecimiento de la roseta por UV-B similar a las plantas salvajes; mientras que las plantas *hag3* muestran una inhibición de crecimiento menor que las plantas salvajes expuestas al UV-B (Figura 12f).

Por otra parte, mientras que la hoja #5 de plantas *hag3* crecidas en condiciones control (que se encontraba en proliferación al momento del tratamiento con UV-B) presentó un área menor al de la misma hoja de plantas salvajes; en plantas irradiadas con UV-B, el área promedio de la hoja #5 fue similar al medido en la misma hoja de plantas salvajes expuestas a esta radiación (Figura 13a).

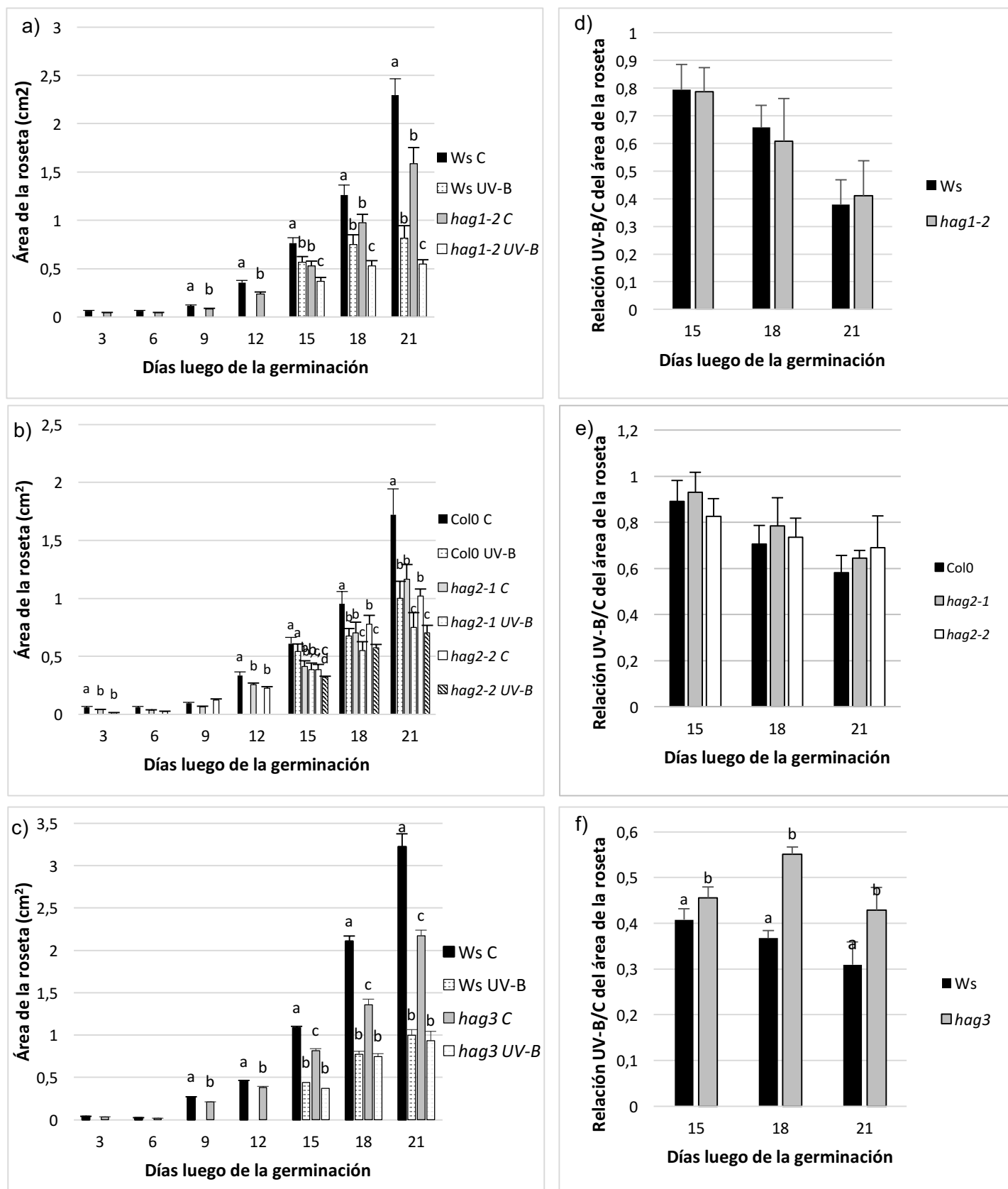


Figura 12. (a-c) Área de la roseta (cm²) de plantas (a) *hag1-2*, (b) *hag2-1* y *hag2-2*, (c) *hag3* y salvajes (*Ws* y *Col0*) expuestas al UV-B y de plantas controles (C) medidas cada 3 días luego de la germinación. Cada barra corresponde al promedio del área de la roseta de al menos 10 plantas y la barra de error corresponde al error estándar (d- f) Área relativa (UV-B/C) de plantas (d) *hag1-2*, (e) *hag2-1*, (f) *hag3* y de plantas salvajes. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones para cada día, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$. Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados similares.

Para evaluar las posibles causas de la menor inhibición del crecimiento de las hojas de plantas *hag3* frente a la radiación UV-B, analizamos si el fenotipo observado era consecuencia de la inhibición de la división y/o de la expansión celular. Para llevar a cabo este objetivo, se calculó el área promedio de las células del parénquima en empalizada de la hoja #5 y el número promedio de células por hoja. Los resultados mostraron que en condiciones control el área de la hoja #5 de las plantas *hag3* es menor al de plantas salvajes (Figura 13a) debido a que si bien poseen una número de células similar (Figura 13b), tienen un menor área celular que el de hojas de plantas salvajes (Figura 13c). Luego del tratamiento con radiación UV-B, el área de la hoja #5

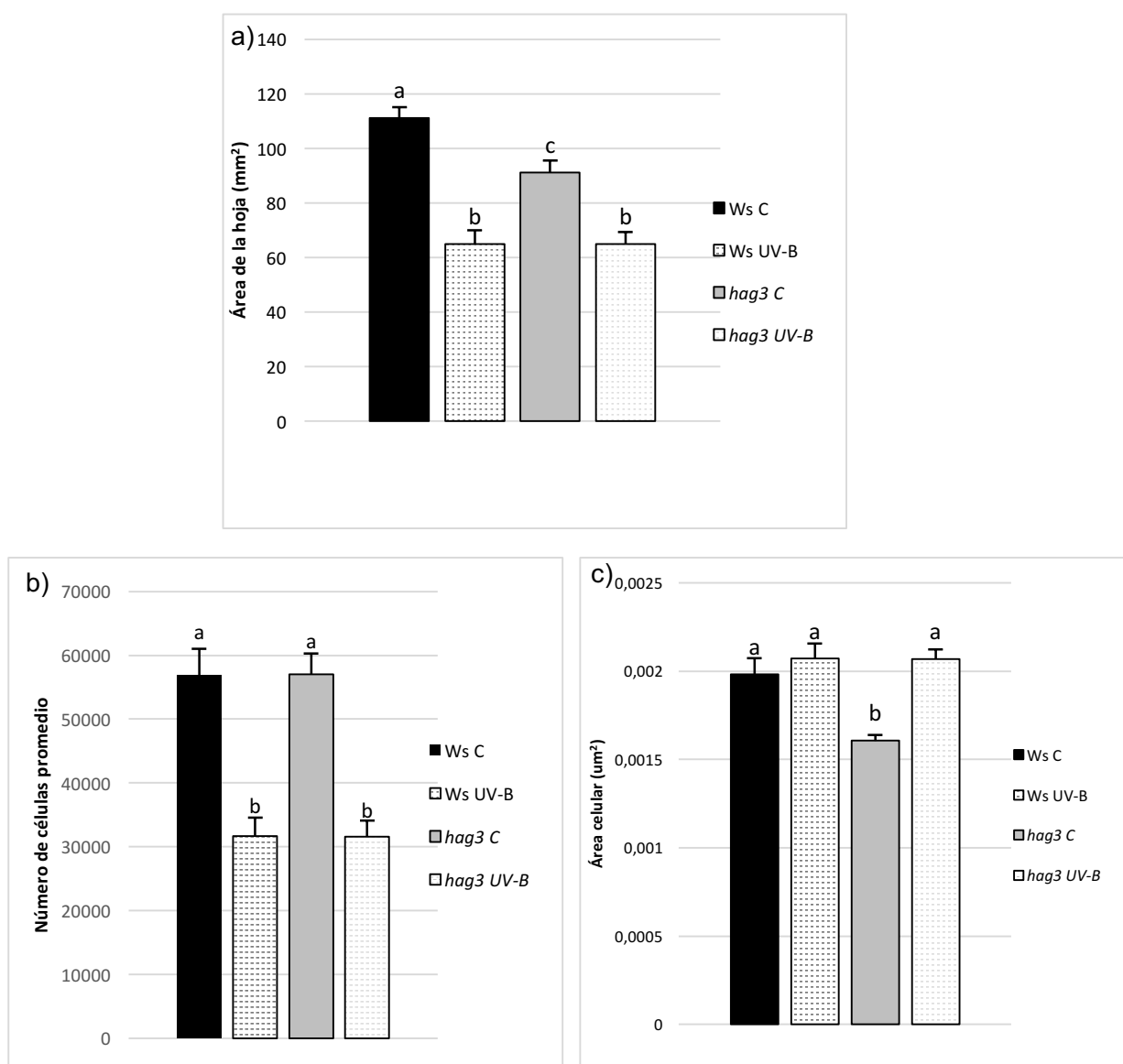


Figura 13. a) Área de la hoja #5 (mm²), b) número de células promedio y c) área celular (um²) de plantas *hag3* y salvajes tratadas con radiación UV-B durante 4 h o mantenidas en condiciones control en ausencia de UV-B (C). Cada barra corresponde al promedio de 10 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado obteniéndose resultados similares. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones (C y UV-B), al aplicar ANOVA con un p<0,05.

de ambas plantas fue similar (Figura 13a), debido a que, a pesar de que luego del tratamiento con UV-B ambas plantas mostraron una inhibición de la proliferación celular similar (Figura 13b), las plantas mutantes *hag3* mostraron un incremento en el área celular (Figura 13c), sugiriendo que un efecto de compensación estaría ocurriendo en las plantas transgénicas luego del tratamiento con UV-B, donde la disminución del número de células conllevaría a un aumento del área celular (Horiguchi y Tsukaya, 2011).

2.4.1.3.1.1 Determinación de los niveles de ploidía de la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *hag3* expuestas a la radiación UV-B

La división celular es un aspecto fundamental en la vida de las plantas y necesita ser rigurosamente regulada para permitir el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas. La actividad oscilante de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas es la responsable de llevar a cabo el correcto funcionamiento del ciclo celular y de determinar si las células deben replicar su ADN o entrar en mitosis (Inzé y De Veylder, 2006). Además de este ciclo celular clásico, algunas células pueden someterse a un ciclo celular alternativo en el que se omiten la mitosis y la citocinesis, pero la replicación continúa, lo que resulta en un aumento del nivel de ploidía del ADN celular. Este fenómeno, denominado endorreduplicación, se encuentra distribuido en una gran cantidad de especies vegetales, a pesar de que su relevancia fisiológica ha sido poco estudiada (Lee y col., 2009). Se han propuesto varias funciones beneficiosas para el proceso de endorreduplicación, tales como la compensación de un genoma pequeño para tolerar las actividades celulares y permitir la expansión de células y el desarrollo de las estructuras celulares específicas, tales como los tricomas (Barow y Meister, 2003; Bramsiepe y col., 2010).

Para evaluar si el efecto de compensación observado en las plantas *hag3* se debía a un aumento en el nivel de ploidía, se determinaron, a través de la técnica de citometría de flujo, los niveles de ploidía en el ADN en la hoja #5 de plantas salvajes y transgénicas, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con radiación UV-B. Para ello, se usaron plantas de 4 semanas las cuales fueron irradiadas con UV-B (2 W.m^{-2} durante 4 h, durante un único día) en el momento en el que la hoja #5 estaba emergiendo, y plantas controles que no fueron expuestas al UV-B. En la Figura 14 se grafica el índice de endorreduplicación, el cual es un parámetro que permite expresar los niveles de endorreduplicación que posee un tejido en una circunstancia determinada (Barow y Meister, 2003). En dicha Figura se puede observar que no hay diferencias en el índice de endorreduplicación entre las muestras analizadas, y por lo tanto no es el nivel de ploidía lo que estaría determinando las diferencias en el área celular de las hojas analizadas.

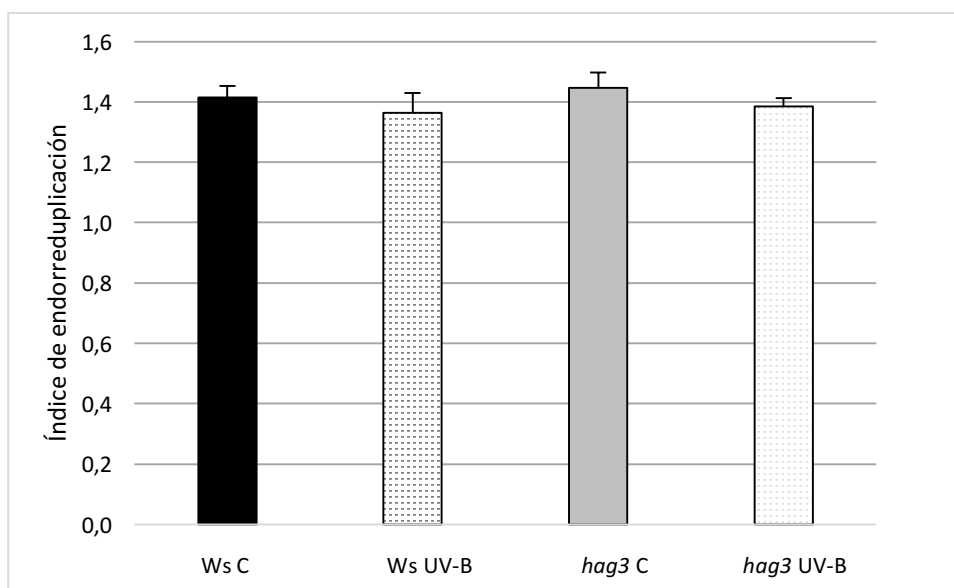


Figura 14: Niveles de ploidía de la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *hag3* expuestas a la radiación UV-B. Índice de endorreduplicación de las plantas de *Arabidopsis* salvajes y transgénicas *hag3* tratadas y sin tratar con UV-B. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.4.1.3.2 Efecto de la radiación UV-B en la elongación de la raíz primaria

A continuación, analizamos el efecto del UV-B en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, debido a que en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, incluyendo el UV-B, existe una respuesta morfogénica común caracterizada por la inhibición de la elongación de la raíz primaria, y un aumento en la producción de raíces laterales o ramas axilares (Potters y col., 2007, 2009).

Para llevar a cabo dicho objetivo, plántulas salvajes y deficientes en la expresión de cada uno de los genes *HAG1-3* fueron crecidas en placas de Petri durante 4 días y luego fueron expuestas durante 1 h a radiación UV-B a una intensidad de 4 W.m^{-2} ; mientras que otro grupo de plantas que no fueron expuestas al UV-B se utilizó como control. Luego del tratamiento, las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo en ausencia de UV-B y se midió la longitud de la raíz durante los cuatro días posteriores a la finalización del tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que tanto las plantas salvajes como las plantas deficientes en la expresión de los genes *HAG1-3* disminuyen la longitud de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B (Figura 15). Por otro lado, tanto en condiciones control en ausencia de UV-B como luego del tratamiento con UV-B, la longitud de la raíz primaria de las plantas *hag1* y *hag2-1* fue similar a la de las plantas salvajes (Figuras 15 a y b). Por el contrario, las plantas *hag3* poseen una raíz primaria

de menor longitud, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B (Figura 15 c). Sin embargo, las plantas transgénicas mostraron una menor inhibición en el crecimiento de la raíz que las plantas salvajes (Figura 15 f). Estos resultados son coincidentes con los resultados obtenidos en la evaluación del área de la roseta, demostrando que las plantas mutantes *hag3* muestran una menor inhibición del crecimiento tanto de las hojas como de la raíz primaria luego de la exposición con UV-B que las plantas salvajes.

2.4.1.4 Determinación de los niveles de pigmentos que absorben UV-B en las plantas salvajes y mutantes *hag*

Por otra parte, se evaluó la acumulación de pigmentos que absorben la radiación UV-B, entre ellos los flavonoides, en plantas deficientes en la expresión de los genes de la familia GNAT, 2 h luego de finalizado el tratamiento con UV-B y en plantas controles no expuestas al UV-B (Figura 16 a-c). Los resultados muestran que tanto las plantas salvajes como las líneas mutantes *hag1* y *hag2-1* aumentan significativamente los niveles de pigmentos que absorben UV-B luego del tratamiento con radiación UV-B; mientras que las plantas *hag3* acumulan un nivel significativamente mayor de estos pigmentos que las plantas salvajes en condiciones control. Luego de la exposición con UV-B, las plantas mutantes *hag3* muestran niveles de pigmentos similares a las plantas salvajes. De manera similar, las plantas *hag3* acumulan mayores niveles de antocianinas en condiciones control que las plantas salvajes y los niveles son similares entre las plantas luego de la exposición al UV-B, (Figura 16d). Estos resultados están de acuerdo a los previamente reportados para diferentes mutantes del complejo Elongator, donde las mismas muestran una elevada concentración de flavonoides en ausencia de UV-B (Zhou y col., 2009).

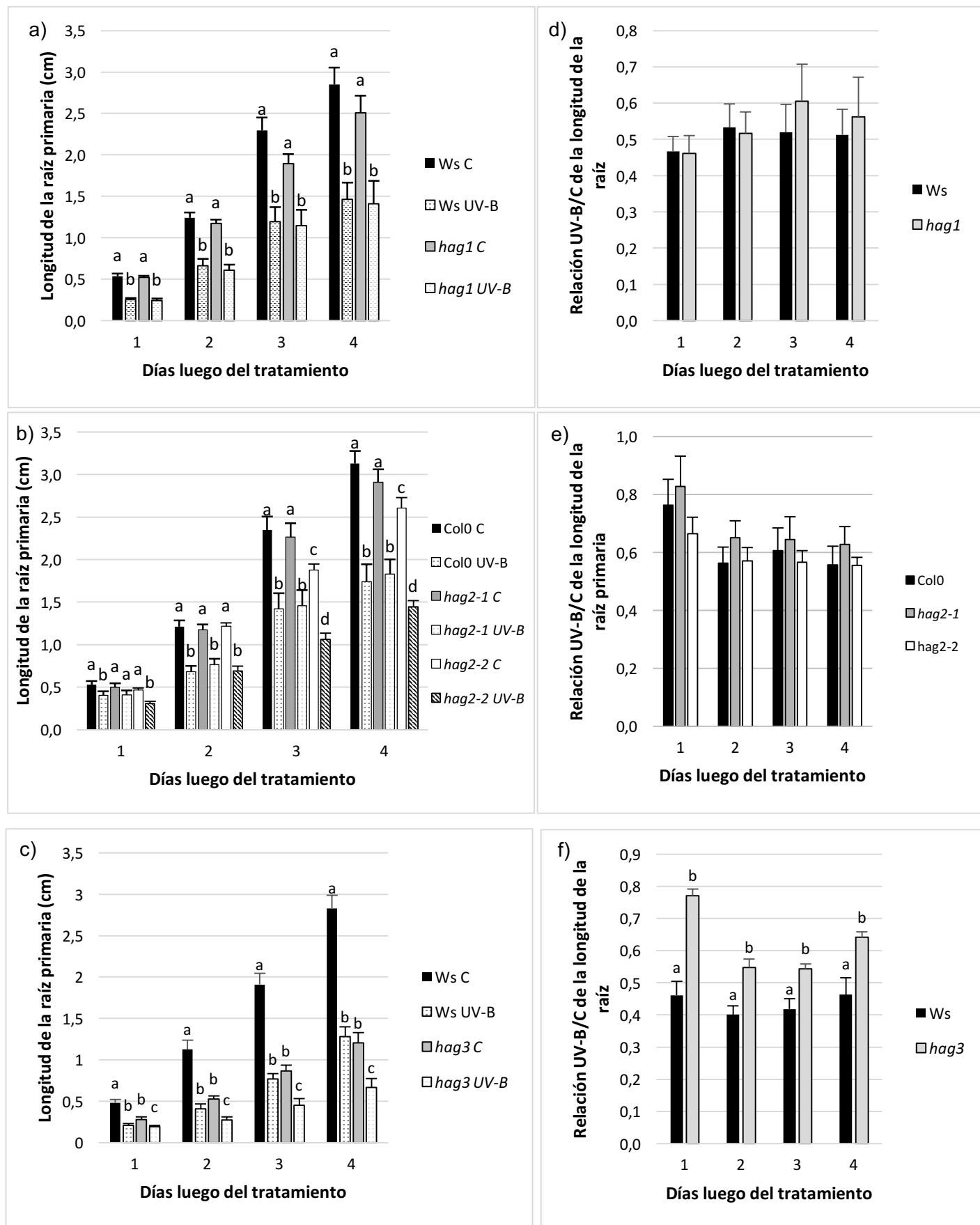


Figura 15. Análisis de la elongación de la raíz primaria luego del tratamiento con radiación UV-B. Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas (a) salvajes Ws y de plantas mutantes *hag1*, (b) plantas salvajes Col0, y plantas mutantes *hag2-1* y *hag2-2* y (c) plantas salvajes Ws y plantas mutantes *hag3* luego del tratamiento con UV-B y en las plantas control (C). (a-c) Longitud de la raíz primaria en función de los días luego del tratamiento (d-f) Longitud relativa de la raíz primaria de plantas tratadas con respecto a las plantas control en función de los días luego del tratamiento. Los experimentos fueron realizados por triplicado obteniéndose resultados similares. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones para cada día, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

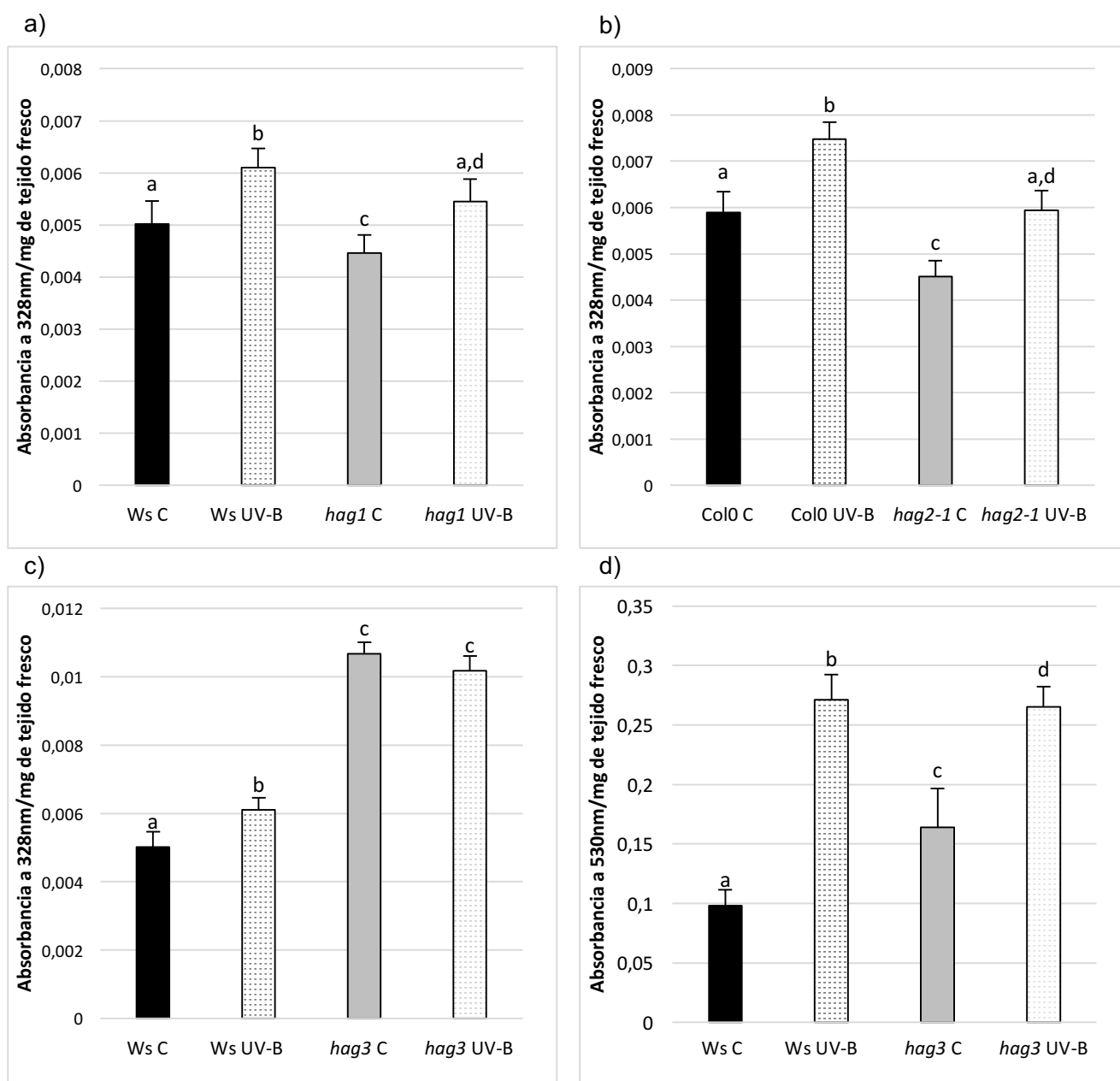


Figura 16. Concentración de pigmentos en hojas de plantas de *Arabidopsis* salvajes y deficientes en la expresión de los genes *HAG*. Contenido de pigmentos que absorben UV-B expresados en valores de absorbancia a 328nm por miligramo de tejido fresco en hojas de plantas salvajes, *hag1* (A), *hag2-1* (B) y *hag3* (C), en condiciones control (C) y luego del tratamiento con UV-B. D) Contenido de antocianinas expresadas en valores de absorbancia a 530nm por miligramo de tejido fresco en hojas de plantas salvajes y *hag3*. Cada barra corresponde al promedio de al menos 10 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado obteniéndose resultados similares. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones (C y UV-B), al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

2.4.1.5 Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia GNAT en la reparación del daño en el ADN inducido por el UV-B

Como fue previamente descrito en la introducción, la absorción directa del UV-B induce la formación de dímeros de pirimidinas adyacentes en las moléculas de ADN, siendo éstas las lesiones predominantes inducidas por este tipo de radiación.

Para determinar si las acetiltransferasas en estudio están involucradas en las respuestas frente al daño y en la reparación del ADN por UV-B, se analizó la acumulación de dímeros de pirimidina por formación de un anillo de ciclobutano (DPCs) en plantas salvajes y deficientes en la expresión de cada uno de los genes *HAG1-3* luego de finalizado el tratamiento con UV-B utilizando la técnica de dot blot, sección 2.3.10.1 de Materiales y Métodos. Un ejemplo de una membrana luego del revelado se muestra en la Figura 17, como puede observarse, las plantas control no presentan daño cuantificable. Las plantas salvajes y las líneas *hag1* y *hag2-1* mostraron un nivel de daño en el ADN similar luego del tratamiento con UV-B, mientras que las plantas *hag3* presentaron un menor nivel de DPCs que las plantas salvajes, sugiriendo que las plantas *hag3* son menos sensibles al daño en el ADN por la radiación UV-B (Figura 18).

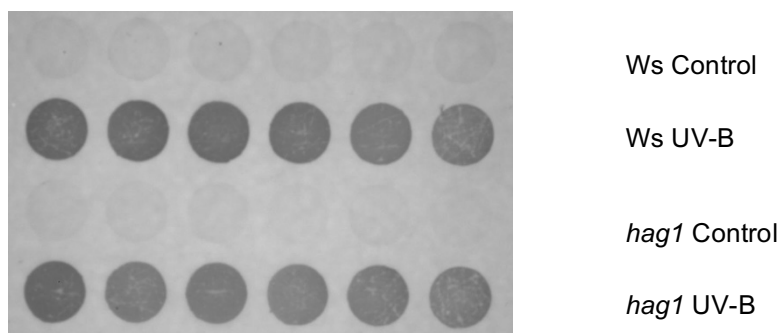


Figura 17. Ejemplo de un ensayo de dot blot para el análisis del daño en el ADN de plantas control y luego del tratamiento con UV-B. Cada punto corresponde al ADN de una muestra biológica independiente.

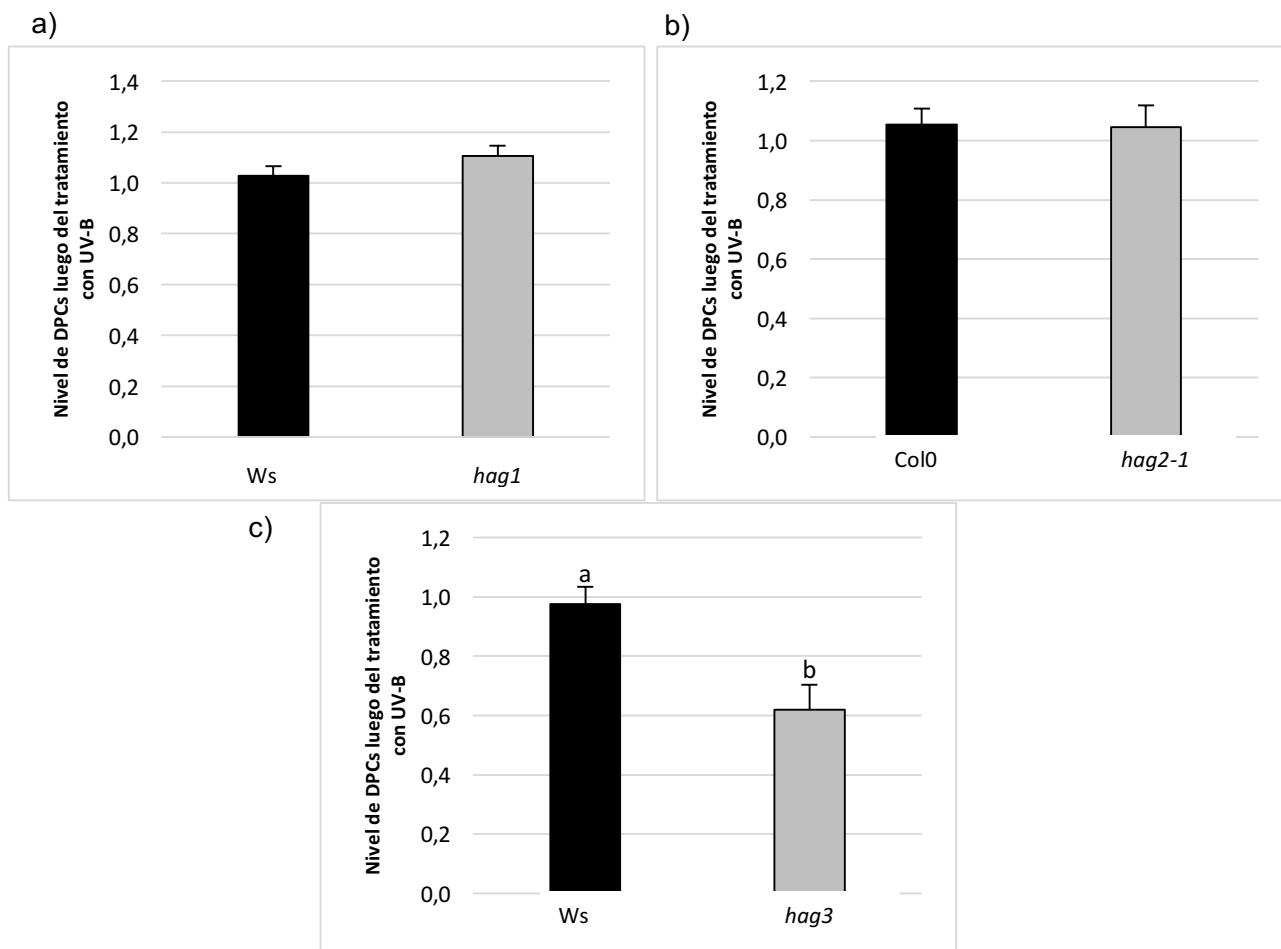


Figura 18. Análisis del daño en el ADN en plantas salvajes (*Ws* y *Col0*), a) transgénicas *hag1*, b) mutantes *hag2-1* y c) transgénicas *hag3* de la familia GNAT. Se muestran los valores de DPCs luego del tratamiento con UV-B. Las plantas control no presentaron daño cuantificable. Cada barra corresponde al promedio de 6 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas, al aplicar t de student con un $p < 0,05$. Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados similares.

2.4.1.6 Análisis de la regulación de la expresión génica de enzimas que participan en la vía de respuesta al UV-B

Con el objetivo de investigar las posibles causas de la menor sensibilidad de las plantas mutantes *hag3* a la radiación UV-B, se midió la expresión de genes que participan en la vía de señalización y en la respuesta a la radiación UV-B mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Para ello, se utilizó ARN de muestras de hojas de plantas salvajes y deficientes en la expresión de los genes *HAG1-3*, en condiciones control y luego de la exposición con UV-B durante 4 h. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la Tabla I, sección Materiales y Métodos.

En primer lugar, se evaluó la expresión de genes que codifican enzimas que participan en los distintos mecanismos de reparación del daño en el ADN. Se determinó la expresión del gen codificante para la fotoliasa *PHR1/UVR2* y de la

proteína *UVR7*, la cual participa en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER). *UVR2* es la fotoliasa encargada de la reparación de los DPCs y es requerida para la supervivencia de las plantas en presencia de radiación UV-B (Landry y col., 1997). La proteína *UVR7* es homóloga a ERCC1 de humanos y mutantes de *Arabidopsis* en el gen que codifica para esta proteína son sensibles a la radiación y UV-B (Hefner y col., 2003). Los resultados obtenidos muestran que los niveles de los transcritos *UVR2* y *UVR7* son mayores en las plantas mutantes *hag3* que en las plantas salvajes en condiciones control en ausencia de UV-B, mientras que luego de la exposición con UV-B ambas plantas muestran niveles similares de los transcritos (Figura 19a).

Por otra parte, se analizó la expresión del gen *HY5*, el cual codifica para un factor de transcripción clave en la regulación de la expresión de genes regulados por UV-B como se describe en la Introducción (Brown y col., 2005). En la Figura 19b se observa que las plantas mutantes *hag3* poseen mayores niveles del transcrito *HY5* tanto en condiciones control como luego de la exposición con UV-B, que las plantas salvajes.

Por último, se analizó la expresión de genes codificantes para las enzimas chalcona sintasa (*CHS*) y flavanona 3 hidroxilasa (*F3H*), involucradas en la vía de síntesis de los flavonoides (Figura 19c). La expresión de los genes *CHS* y *F3H* también se encuentra aumentada en condiciones control en ausencia de UV-B en las plantas *hag3* en comparación a las plantas salvajes. En síntesis, los resultados indican que todos los transcritos analizados se encuentran incrementados en condiciones control en ausencia de UV-B en las plantas mutantes *hag3* con respecto a las plantas salvajes, demostrando que *HAG3* participa en la regulación de la expresión de genes que participan en la respuesta al UV-B en *Arabidopsis*.

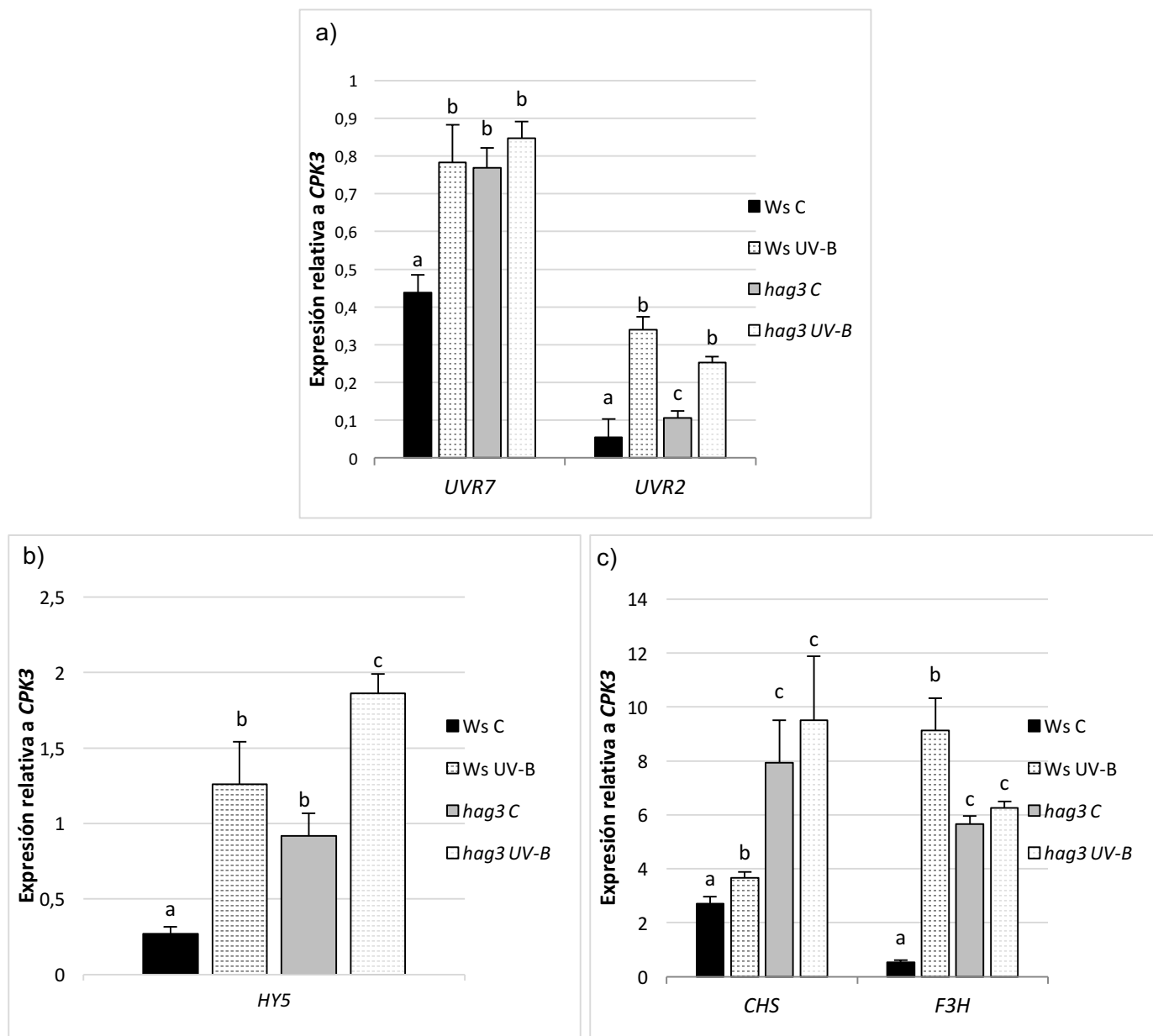


Figura 19: Análisis de la expresión de los genes a) *UVR7* y *UVR2*, b) *HY5*, c) *CHS* y *F3H* en plantas mutantes *hag3* y en plantas salvajes. Los niveles de los transcritos se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real en plantas transgénicas *hag3* y salvajes Ws, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones (C y UV-B) para cada gen analizado, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$. Cada barra corresponde al promedio de 6 plantas y la barra de error corresponde al error estándar.

A continuación, determinamos los niveles de los mismos transcritos en las plantas *hag1* y *hag2-1* (Figura 20). Como puede observarse, a pesar de que algunos transcritos de la vía de respuesta al UV-B presentaron niveles similares en plantas mutantes *hag1*, *hag2-1* y salvajes, otros genes mostraron un patrón de expresión diferencial entre dichas plantas. Por ejemplo, la expresión de *UVR7*, *CHS* y *F3H* es menor en las plantas *hag1* que en las salvajes, tanto en condiciones control como

luego de la exposición con UV-B; mientras que en las plantas *hag2-1*, los niveles de los transcritos *UVR2*, *HY5* y *F3H* son diferentes a los de las plantas salvajes Col0, ya sea en condición control (*HY5*, *F3H*) o luego de la exposición al UV-B (*UVR2*, *HY5*).

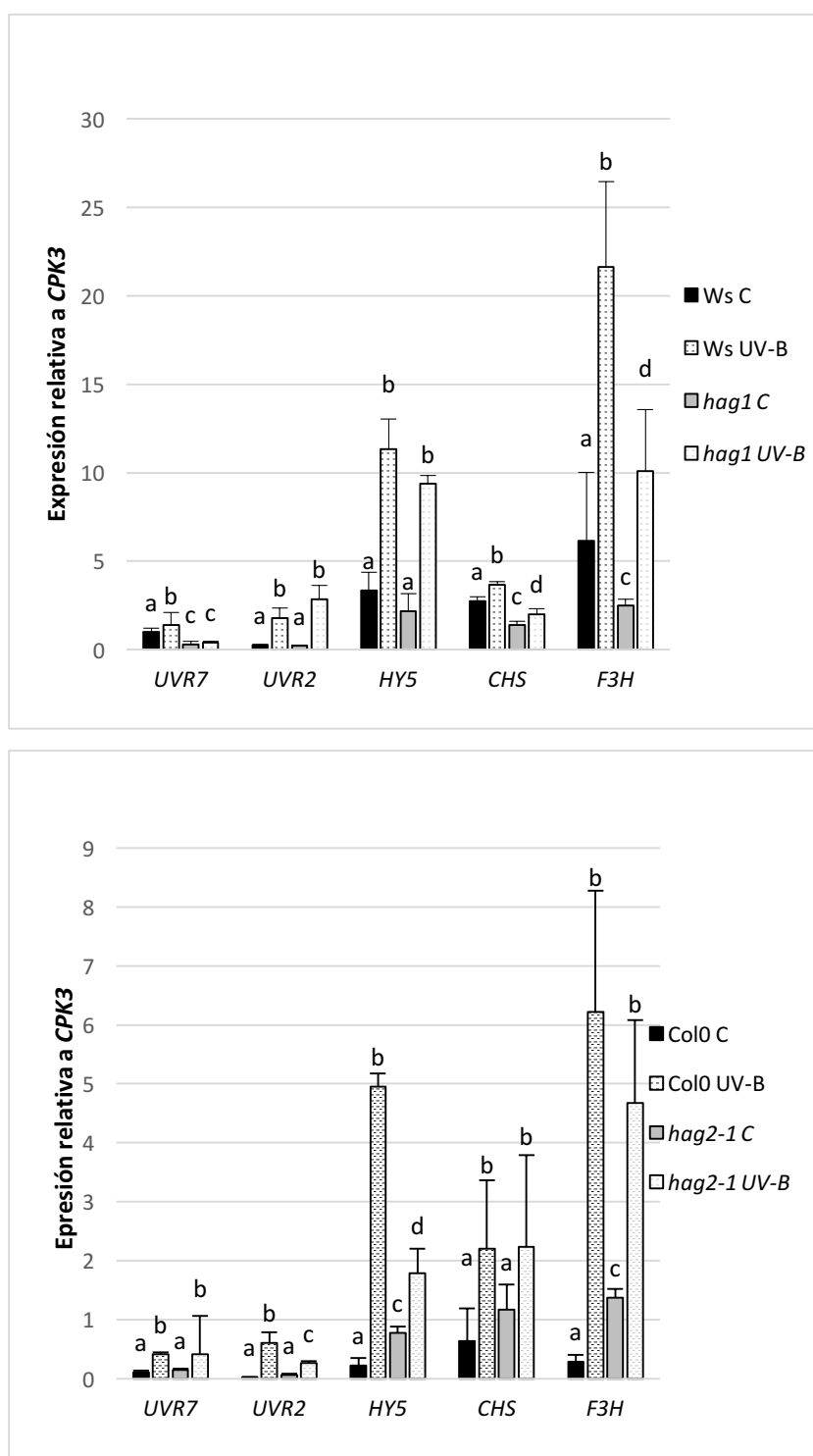


Figura 20: Análisis de la expresión de los genes *UVR2*, *UVR7*, *HY5*, *CHS* y *F3H* en plantas mutantes *hag1* a) y *hag2-1* b) y en plantas salvajes. A Los niveles de los transcritos se analizaron mediante RT-PCR real time en las plantas mutantes y salvajes, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones (C y UV-B) para cada gen, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

2.4.1.7 Conclusiones y discusión

Tanto en plantas de maíz como en *Arabidopsis*, el remodelado de la cromatina y la acetilación de histonas se encuentran implicadas en las respuestas a la radiación UV-B y en la reparación del daño en el ADN (Casati y col., 2006; Shaked y col., 2006; Osley y col., 2007; Campi y col., 2012). Previamente, en el laboratorio se analizó el efecto de la acetilación de histonas en la reparación del ADN y se demostró que plantas tratadas con curcumina, un inhibidor de histonas acetiltransferasas, muestran deficiencias en la reparación del daño en el ADN. Por otro lado, plantas mutantes de *Arabidopsis* en los genes *HAM1* y *HAM2*, dos histonas acetiltransferasas de la familia MYST, mostraron mayor daño en el ADN luego de un tratamiento de 4 h con radiación UV-B (Campi y col., 2012). *Arabidopsis* posee 12 histonas acetiltransferasas diferentes, agrupadas en 4 familias. En esta parte del capítulo analizamos si las histonas acetiltransferasas de la familia GNAT (*HAG1*, *HAG2* y *HAG3*) poseen un rol en las distintas respuestas a la radiación UV-B en *Arabidopsis*. Como fue descrito anteriormente, la proteína *HAG1* participa en el desarrollo de las plantas y en la regulación de la expresión de genes involucrados en el estrés por frío y luz (Servet y col., 2010). La expresión de *HAG2* se encuentra regulada por el factor de transcripción E2F que regula la progresión del ciclo celular y la replicación del ADN (Vandepoele y col., 2005), mientras que *HAG3* es una subunidad del complejo Elongator. Además, se demostró que Elongator es un complejo histona acetiltransferasa que interactúa directamente con la ARN polimerasa II durante la elongación transcripcional en diferentes organismos eucariotas (Otero y col., 1999; Chen y col., 2006) y que participa en diferentes procesos celulares, tales como la acetilación de la histona H3 y H4 durante la elongación de la transcripción, la modificación de algunos ARN de transferencia y la acetilación de la tubulina (Otero y col., 1999; Fellows y col., 2000; Huang y col., 2005; Creppe y col., 2009). Mutaciones en las diferentes subunidades del complejo resultaron en plantas con hipersensibilidad al ABA, resistencia al estrés oxidativo, con mayor susceptibilidad a enfermedades y alteraciones en la progresión del ciclo celular (Nelissen y col., 2005; Chen y col., 2006; Defraia y col., 2010). Más aun, mutaciones en el complejo Elongator de *Arabidopsis* conllevan a la expresión diferencial de algunos genes, por ejemplo, Zhou y col. (2009) reportaron que distintas plantas mutantes en el complejo Elongator poseen aumentados los transcritos involucrados en la biosíntesis de antocianinas, y en consecuencia, las plantas mutantes acumulan mayores niveles de antocianinas que las plantas salvajes.

Por otro lado, la absorción de la radiación UV-B puede causar daño directamente en el ADN, formando mayoritariamente DPCs, los cuales bloquean la síntesis del ADN durante la replicación e interfiere con la síntesis del ARN durante la

transcripción, con lo cual es sumamente importante que los dímeros sean reparados para la supervivencia de la célula (Friedberg, 2003). Nuestros resultados mostraron que las plantas transgénicas *hag3* poseen menores niveles de DPCs que las plantas salvajes *Ws* luego del tratamiento con radiación UV-B, mientras que las plantas mutantes *hag1* y *hag2* presentaron niveles similares de daño en el ADN que sus respectivas plantas salvajes. Es interesante el hecho que el transcripto *PHR1/UVR2*, que codifica para una fotoliasa de DPCs, y el transcripto *UVR7*, involucrado en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, se encuentran aumentados en las plantas *hag3* en comparación a las plantas salvajes en condiciones control en ausencia de UV-B, sugiriendo que la menor acumulación de fotoproductos luego del tratamiento con UV-B puede deberse a que los sistemas de reparación se encuentran inducidos en las plantas transgénicas.

Además, las plantas han evolucionado distintos mecanismos para filtrar o absorber el UV-B como mecanismo de protección del daño en el ADN (Mazza y col., 2000; Bieza y Lois, 2001). Las plantas transgénicas *hag3* mostraron niveles aumentados de pigmentos que absorben el UV-B y de antocianinas; esta característica ya había sido reportado para otras plantas mutantes del complejo Elongator (Zhou y col., 2009). Por lo tanto, el menor daño en el ADN observado en las plantas mutantes podría ser, también o alternativamente, debido a los mayores niveles de compuestos fotoprotectores. Además, observamos que el transcripto *HY5* presenta mayores niveles de expresión en las plantas transgénicas *hag3*; este factor de transcripción es un regulador central de varios genes involucrados en la respuesta a la radiación UV-B. Por lo tanto, es posible que diferentes mecanismos de protección al UV-B se encuentren aumentados en las plantas *hag3* en condiciones control; y que ésta sea una posible causa de la mayor tolerancia de las mismas a la radiación UV-B. En concordancia con nuestros resultados, se reportó que otras plantas mutantes del complejo Elongator son más tolerantes a distintos tipos de estrés, como por ejemplo, al estrés oxidativo causado por metil viológeno y H_2O_2 y al estrés por sequía (Chen y col., 2006; Zhou y col., 2009).

Los menores niveles de DPCs encontrados en plantas *hag3* luego del tratamiento con UV-B se correlacionan con la menor inhibición del área de la roseta y de la longitud de la raíz primaria, demostrando que estas plantas presentan mayor tolerancia a la radiación UV-B. Además, observamos que las plantas *hag3* en condiciones control presentaron una roseta más pequeña y un retraso en el crecimiento de la raíz primaria, al igual que como fue previamente reportado por Nelissen y col. (2003 y 2005). Demostramos también que el menor área de la roseta se debe a una disminución en el área celular y no a la cantidad de células de la hoja.

Por otro lado, luego del tratamiento con UV-B, las plantas salvajes y las mutantes presentaron una roseta más pequeña, debido a la inhibición de la proliferación celular, en concordancia con lo observado por Casadevall y col. (2013). Sin embargo, a pesar de que el área celular no se modificó luego del tratamiento con UV-B en las plantas salvajes, las plantas transgénicas *hag3* mostraron un aumento significativo en el área de las células, alcanzando un tamaño similar al de las plantas salvajes. Nuestra hipótesis es que existiría un efecto de compensación luego del tratamiento con radiación UV-B para que la hoja #5 de las plantas transgénicas, las cuales ya son más pequeñas cuando las plantas son crecidas en ausencia de UV-B, no disminuyan aún más su tamaño. En este sentido, en las plantas *hag3* luego del tratamiento con UV-B, posiblemente la disminución en la proliferación celular induciría la expansión celular. Este efecto de compensación fue observado previamente por otros grupos de investigación (Horiguchi y Tsukaya, 2011), y en este caso el aumento del área celular no se correlaciona con los niveles de ploidía del ADN en la hoja #5 de las plantas *hag3*.

Por otro lado, las plantas mutantes *hag1* y *hag2* no mostraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de la roseta y de la raíz primaria con respecto a las plantas salvajes. Sin embargo, a pesar de que las plantas mutantes *hag1* y *hag2* mostraron fenotipos similares a los de las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B, poseen patrones diferenciales de expresión de algunos genes involucrados en la vía de la respuesta y señalización del UV-B. HAG1, HAG2 y HAG3 poseen únicamente en común el dominio histona acetiltransferasa, dado que tienen poca similitud de secuencia de aminoácidos y acetilan histonas en distintos residuos de lisina (Earley y col., 2007; Xu y col., 2012). Además, como se mencionó anteriormente, se evidenció que estas proteínas tienen diferentes funciones en *Arabidopsis* (Sternier y Berger, 2000; Nelissen y col., 2005; Vandepoele y col., 2005; Chen y col., 2006; Defraia y col., 2010; Xu y col., 2012). Por lo tanto, es posible que HAG1 y HAG2 también participen en algún aspecto de la vía de respuesta a la radiación UV-B en *Arabidopsis*, pero los resultados descriptos en este trabajo de Tesis sugieren que sería en otros procesos que los regulados por HAG3, de acuerdo a las diferencias que poseen en estructura y función.

En conclusión, los resultados demuestran que HAG3 regula negativamente la expresión de genes que participan en la respuesta al UV-B en *Arabidopsis*, como por ejemplo los genes que codifican a enzimas involucrados en la reparación del daño en el ADN y de enzimas que participan en la biosíntesis de compuestos fotoprotectores; y por ello las plantas deficientes en la expresión de este gen serían más tolerantes a la radiación UV-B que las plantas salvajes.

2.4.2 Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 en respuesta a la radiación UV-B

En animales, CBP/p300 es una importante subfamilia de histonas acetiltransferasas involucrada en una gran cantidad de actividades celulares, tales como la reparación del ADN, el crecimiento y la diferenciación celular y la apoptosis (Goodman y Smolik, 2000). A diferencia de los animales, donde sólo se reportaron 1 o 2 proteínas CBP, en *Arabidopsis* la familia CBP/p300 está compuesta por 5 proteínas: HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12 (Pandey y col., 2002). Los porcentajes de similitud entre las secuencias y la organización de las estructuras proteicas se presentan en las Tabla III y en la Figura 21, respectivamente. Todas ellas presentan dominios proteicos similares con un dominio histona acetiltransferasa rico en cisteínas (Dominio CBP); sin embargo, la proteína HAC2 no posee el dominio TAZ más cercano al extremo amino terminal, y estudios *in vitro* demostraron que no posee actividad acetiltransferasa (Bordoli y col., 2001; Figura 21).

Además, los transcritos de las cinco proteínas presentan un patrón de expresión diferente; si bien todos los transcritos se expresan en hojas en estado vegetativo, *HAC1* y *HAC12* se expresan mayoritariamente en hojas caulinares, *HAC2* y *HAC5* se expresan mayoritariamente en polen y *HAC1* y *HAC4* se expresan mayoritariamente en semillas (Figura 22).

En *Arabidopsis*, tres de los cinco genes *HAC* (*HAC1*, *HAC5* y *HAC12*) tienen funciones redundantes, promoviendo la floración a través de la represión de la expresión del represor floral central *FLC*; sin embargo *HAC1* tiene un rol dominante sobre *HAC5* y *HAC12*, mientras que la proteína *HAC5* tiene un rol más importante que *HAC12* (Deng y col., 2007; Han y col., 2007). Además, estos genes tienen otros roles en el desarrollo de las plantas, evidenciado por la formación de hojas más pequeñas y por la fertilidad reducida de las plantas *hac1 hac5* y *hac1 hac12* (Han y col., 2007).

Por otro lado, las proteínas *HAC* están involucradas en la vía de señalización del etileno y en la respuesta mediada por esta hormona en la oscuridad. Los niveles de etileno se ven incrementados en las dobles mutantes *hac1hac5* y *hac1hac12*, indicando nuevamente que *HAC1*, *HAC5* y *HAC12* actúan en forma redundante. Sin embargo, *HAC1* posee un rol más importante en esta respuesta, ya que las mutantes simples *hac5* o *hac12* no presentan un fenotipo evidenciable de respuesta al etileno mientras si lo hacen las mutantes *hac1* (Li y col., 2014).

	HAC2	HAC4	HAC5	HAC1	HAC12
HAC2	100%	32,81%	30,85%	33,57%	32,96%
HAC4	32,81%	100%	57,90%	49,67%	48,87%
HAC5	30,85%	57,90%	100%	52,26%	50,87%
HAC1	33,57%	49,67%	52,26%	100%	77,70%
HAC12	32,96%	48,87%	50,87%	77,70%	100%

Tabla III. Porcentajes de similitud de secuencia de las proteínas HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12.

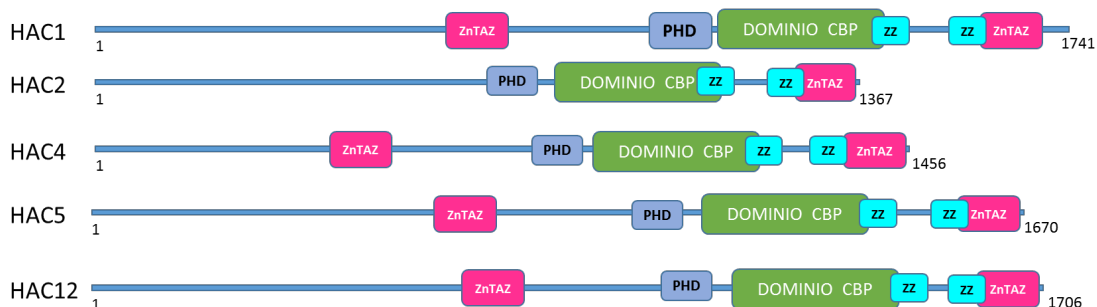


Figura 21. Representación esquemática de la organización de los dominios de las proteínas CBP en Arabidopsis. Los diferentes dominios están representados con distintos colores. El dominio CBP está conservado entre plantas y animales, aunque en plantas el dominio ZZ-dedo de zinc está cerca del extremo C-terminal del dominio HAT. Adaptado de la base de datos Pfam.

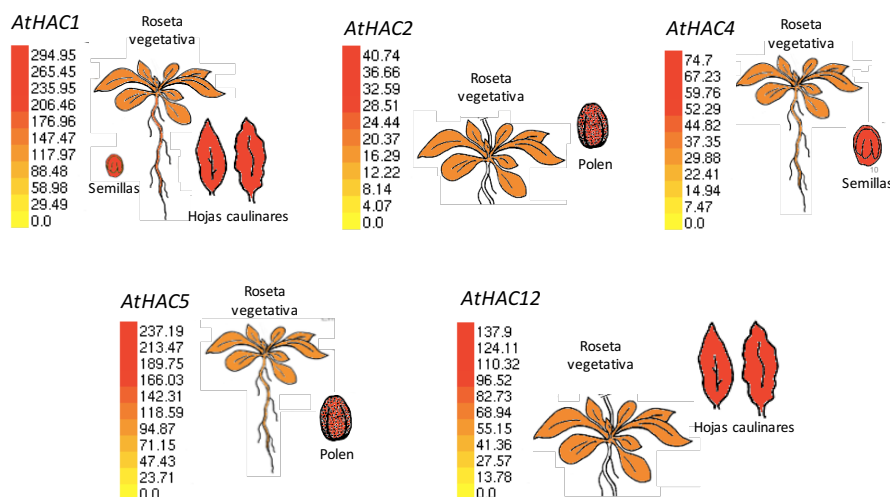


Figura 22. Patrón de expresión de los transcritos HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12 en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de EfpBrowser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

2.4.2.1 Regulación de la expresión de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 por UV-B

De manera similar al análisis realizado con los miembros de la familia GNAT, se estudió si la expresión de genes que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 son regulados por la radiación UV-B en plantas salvajes de *Arabidopsis*. La Figura 23 muestra que no hay cambios significativos en los niveles de expresión del gen *HAC2* en plantas salvajes crecidas en condiciones control con respecto a los niveles de plantas expuestas al UV-B, mientras que los niveles de *HAC1*, *HAC4*, *HAC5* y *HAC12* disminuyen significativamente luego del tratamiento con esta radiación.

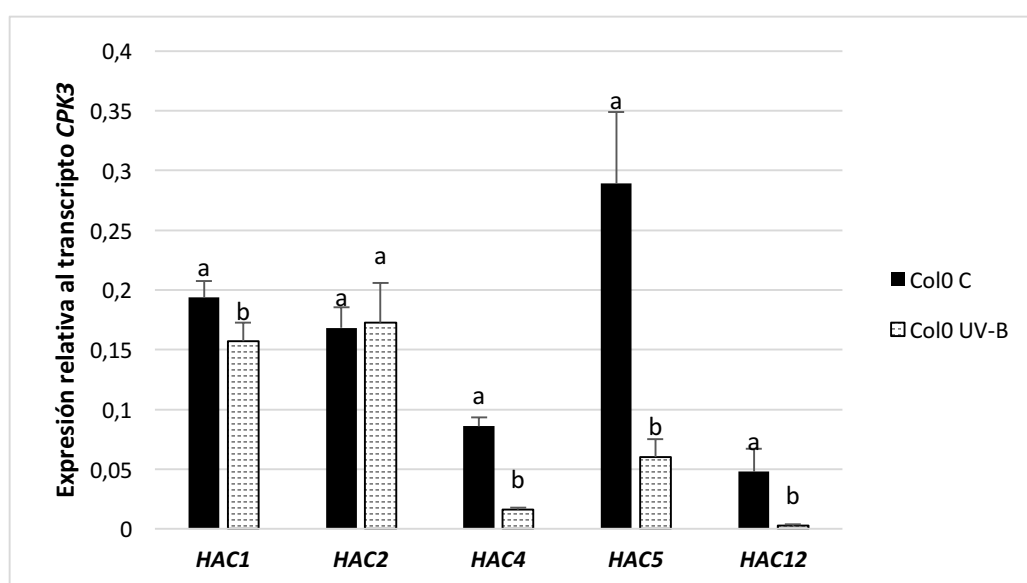


Figura 23: Niveles de expresión relativa de transcritos que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300. Los niveles de transcritos *HAC1*, *HAC2*, *HAC4*, *HAC5* y *HAC12* se midieron en plantas crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B y luego de la exposición con radiación UV-B por 4h en plantas de *Arabidopsis* Col0. Las barras de error corresponden a los errores estándar y las letras muestran diferencias significativas entre control y UV-B, al aplicar t de student con un $p < 0,05$. Para la normalización de los datos se utilizó el transcrito del gen *CPK3*.

2.4.2.2 Identificación de plantas de *A. thaliana* deficientes en los genes de la familia CBP/p300

Para analizar el rol de las proteínas de la familia CBP en distintas respuestas al UV-B se utilizaron plantas de *Arabidopsis* que presentan una supresión o disminución en la expresión de cada una de las 5 histonas acetiltransferasas. Para ello se utilizaron plantas transgénicas con disminución en los niveles de expresión utilizando un ARN de interferencia (ARNi) para el gen *HAC2*, y plantas mutantes por inserción de ADN de transferencia de *Agrobacterium tumefaciens* (ADN-T) en los genes *HAC1*, *HAC4*, *HAC5* y *HAC12* obtenidas del *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC). Las líneas utilizadas se detallan en Materiales y Métodos.

Al igual que las plantas transgénicas de la familia GNAT, las plantas *hac2-2* y *hac2-3* se seleccionaron primero con el herbicida para el cual poseen resistencia y en segundo lugar, el nivel de expresión de *HAC2* se midió por RT-PCR en tiempo real en las plantas resistentes para verificar que los niveles de transcriptos se encuentren disminuidos en comparación a los medidos en plantas salvajes (Figura 24).

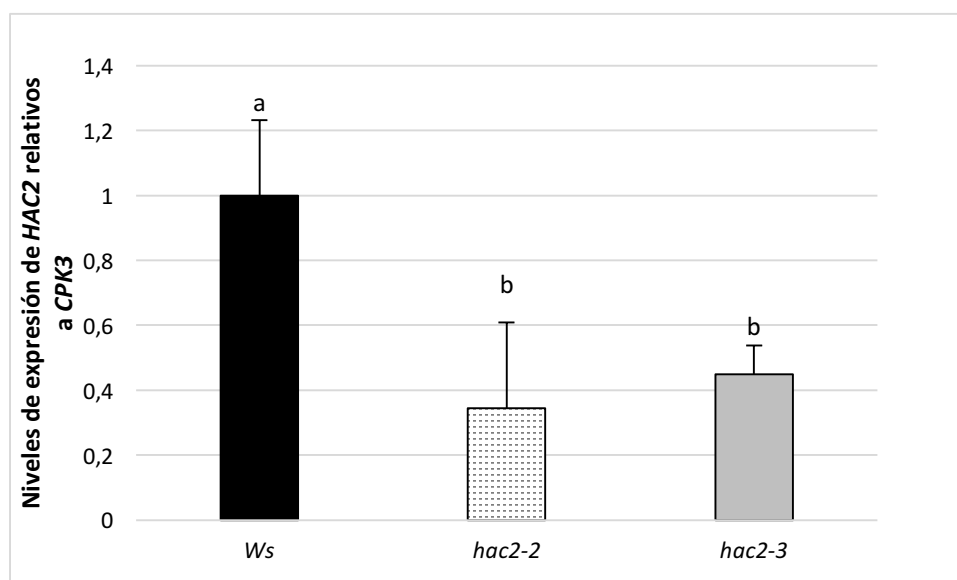


Figura 24. Expresión relativa a *CPK3* de *HAC2* en plantas transgénicas *hac2-2*, *hac2-3* y en plantas salvajes *Ws*. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

2.4.2.2.1 Selección de plantas mutantes homocigotas por inserción de ADN-T

Al igual que lo realizado para las plantas mutantes de la familia GNAT, las semillas de las plantas mutantes de la familia CBP/p300 se sembraron en bandejas plásticas y se utilizó una hoja de las mismas para la extracción de ADN genómico. A modo de ejemplo, en las Figuras 25 y 26 se muestra que se encontraron plantas homocigotas para una de las líneas de cada gen en estudio.

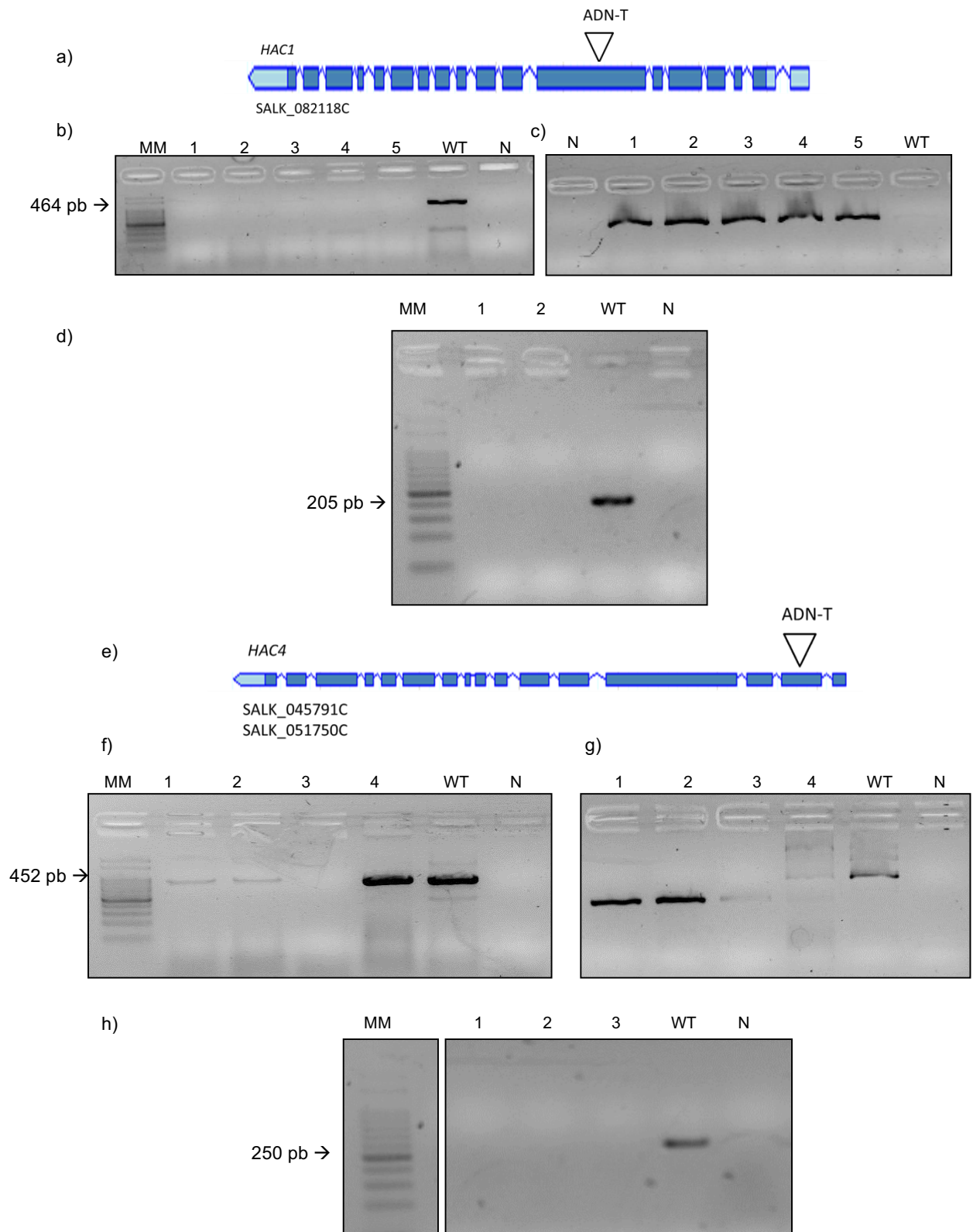


Figura 25: Identificación de mutantes homocigotas *hac1-1* y *hac4-1*. a) y e) Esquema del gen *HAC1* y *HAC4* de *A. thaliana*, respectivamente. El sitio de inserción del ADN-T se indica con un triángulo invertido. b), c), f) y g) Análisis de los productos de PCR separados en un gel de agarosa 1% (P/V). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando ADN genómico y los cebadores b) *HAC1*-1L – *HAC1*-1R, c) los cebadores LB SALK – *HAC1*-1L o f) los cebadores *HAC4*-1L – *HAC4*-1R y g) los cebadores LB SALK – *HAC4*-1L. d) y h) RT-PCR a partir del ADNc de plantas homocigotas *hac1-1* y *hac4-1* utilizando los primers *HAC1*-1ARNmL – *HAC1*-1ARNmR y *HAC4*-1ARNmL – *HAC4*-1ARNmR, respectivamente. Referencias: MM, marcador molecular; WT, reacciones de PCR realizadas utilizando muestra de planta salvaje; N, control negativo de la PCR. Los números de las calles indican las plantas analizadas.

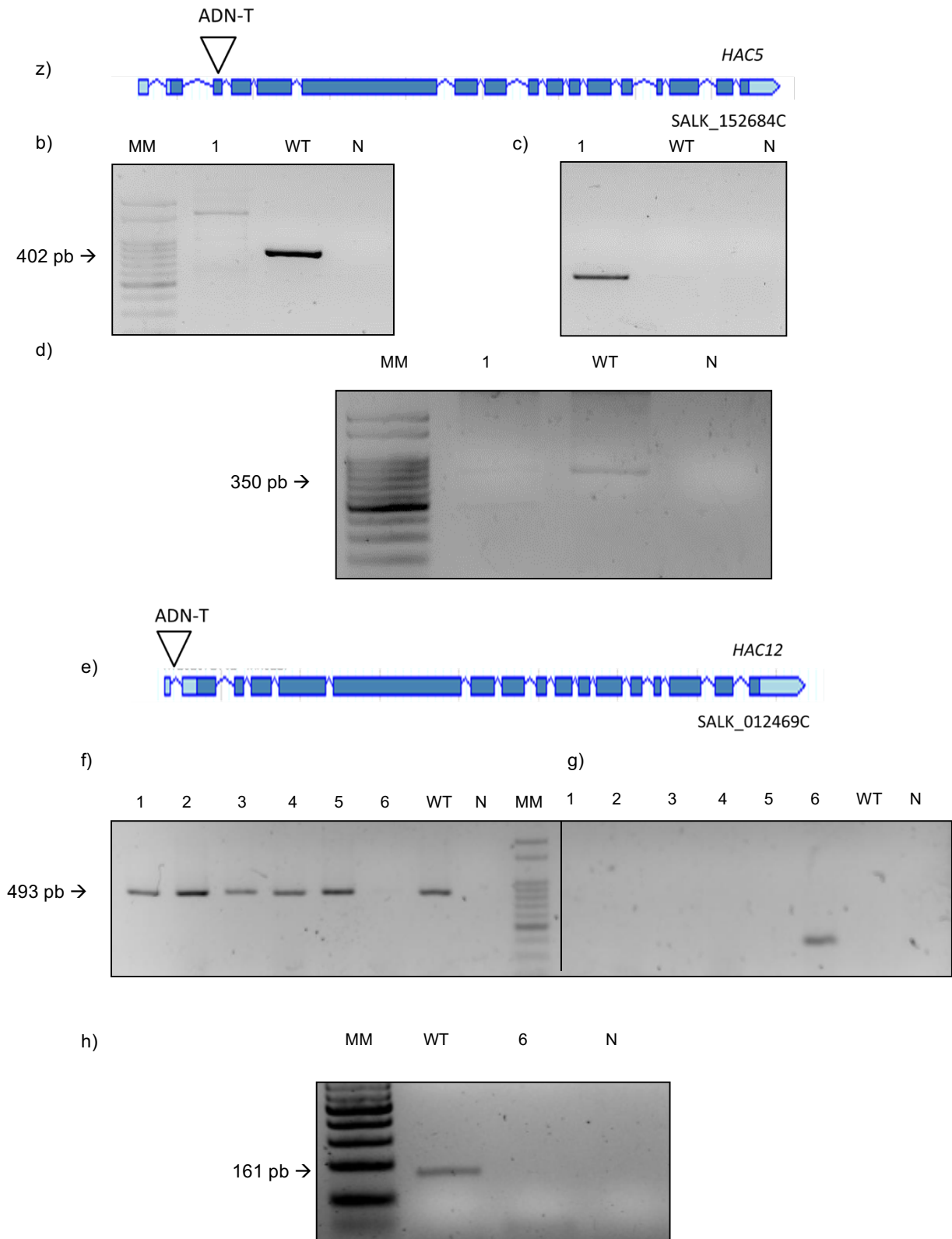


Figura 26: Identificación de mutantes homocigotas *hac5-7* y *hac12-2*. a) y e) Esquema del gen *HAC5* y *HAC12* de *A. thaliana*, respectivamente. El sitio de inserción del ADN-T se indica con un triángulo invertido. b), c), f), g) Análisis de los productos de PCR separados en un gel de agarosa 1% (P/V). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando ADN genómico y los cebadores b) *HAC5-7L* – *HAC5-7R* y c) los cebadores LB SALK – *HAC5-7L* o f) los cebadores *HAC12-2L* – *HAC12-2R* y g) los cebadores LB SALK – *HAC12-2L*. d) y h) RT-PCR a partir del ADNc de plantas homocigotas *hac5-7* y *hac12-2* utilizando los primers *HAC5-ARNmL* – *HAC5-ARNmR* y *HAC12-ARNmL* – *HAC12-ARNmR*, respectivamente. Referencias: MM, marcador molecular; WT, reacciones de PCR realizadas utilizando muestra de planta salvaje; N, control negativo de la PCR. Los números de las calles indican las plantas analizadas.

2.4.2.3 Caracterización fenotípica de plantas deficientes en la expresión de histonas acetiltransferasas de la familia CBP expuestas a la radiación UV-B

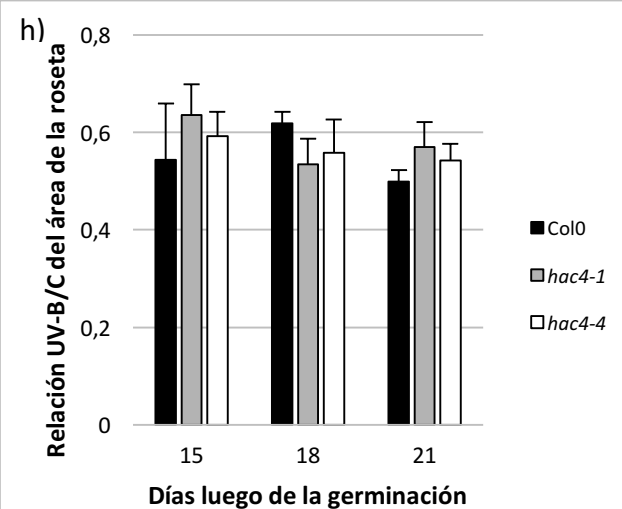
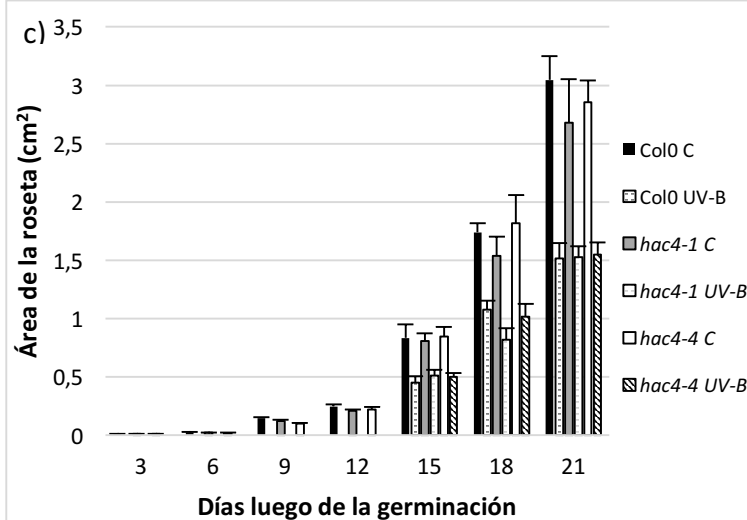
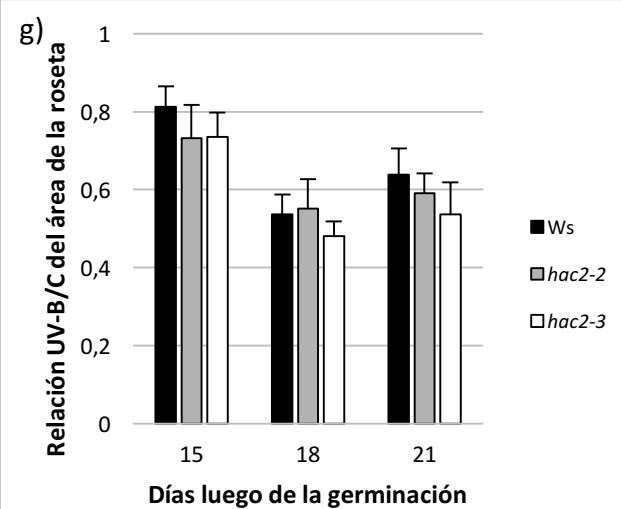
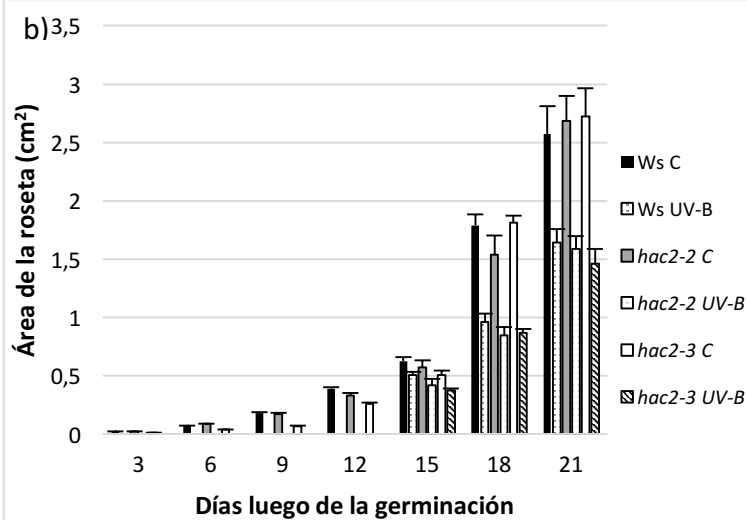
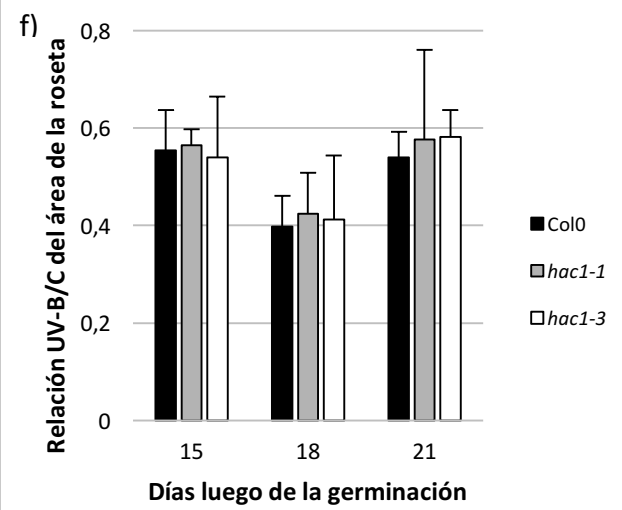
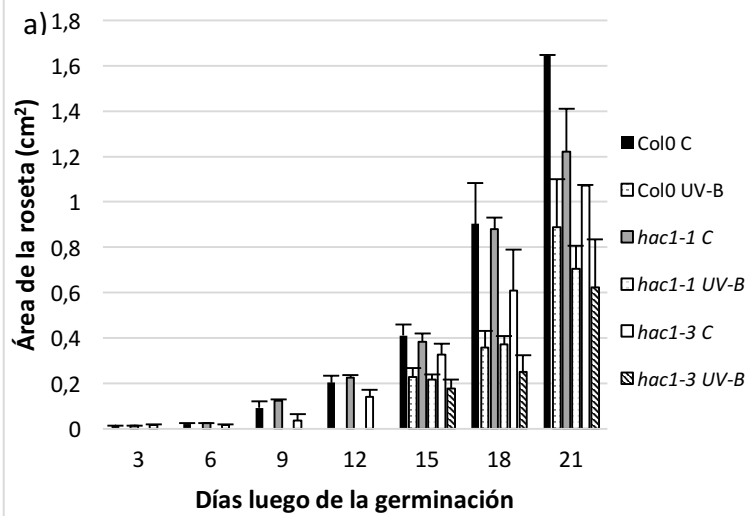
2.4.2.3.1 Efecto de la radiación UV-B sobre el área de la roseta

Como fue expuesto en la introducción, entre los efectos morfológicos causados por la radiación UV-B se incluye la reducción de la longitud de la hoja y del área foliar (Farooq y col., 2005; Zinser y col., 2007; Casadevall y col., 2013; Reddy y col., 2013; Takshak y Agrawal, 2014). De manera similar a lo estudiado para los miembros de la familia GNAT, se analizó el efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de las hojas de plantas mutantes y transgénicas con disminución en la expresión de genes de la familia CBP/p300 y se comparó con el crecimiento de las hojas de plantas salvajes.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto las plantas salvajes como las mutantes y las transgénicas analizadas disminuyen su tamaño luego del tratamiento con UV-B, y que todas las plantas deficientes en la expresión de cada una de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 presentan una inhibición del crecimiento de la roseta por UV-B similar al de las plantas salvajes (Figura 27).

2.4.2.3.2 Efecto de la radiación UV-B en la elongación de la raíz primaria

A continuación analizamos el efecto del UV-B en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria de las plantas *hac*. Tanto las plantas salvajes como las plantas deficientes en la expresión de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 disminuyeron la longitud de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B, sin embargo todas las plantas mutantes y transgénicas analizadas presentaron una inhibición de la elongación de la raíz primaria por UV-B similar a la de las plantas salvajes (Figura 28).



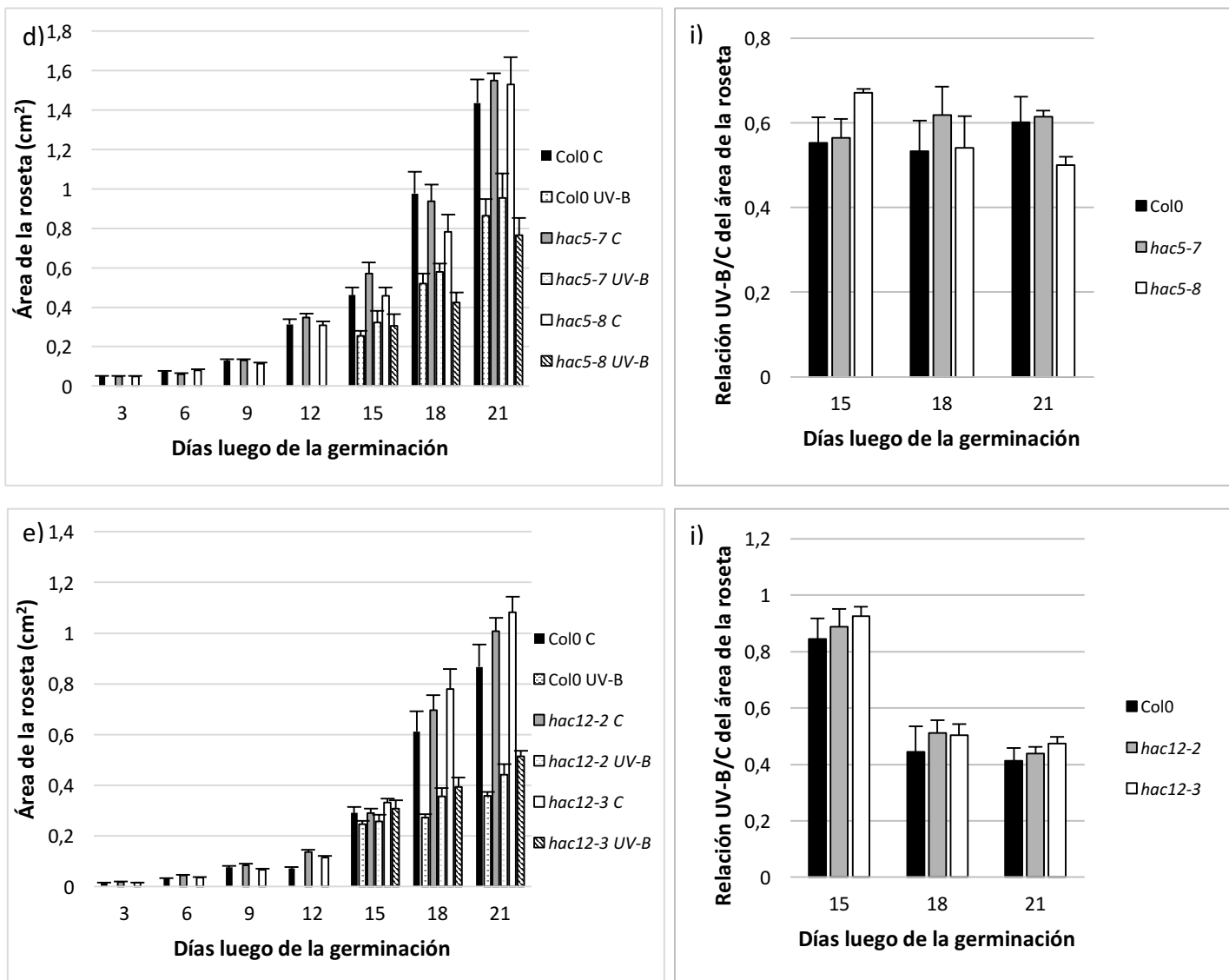
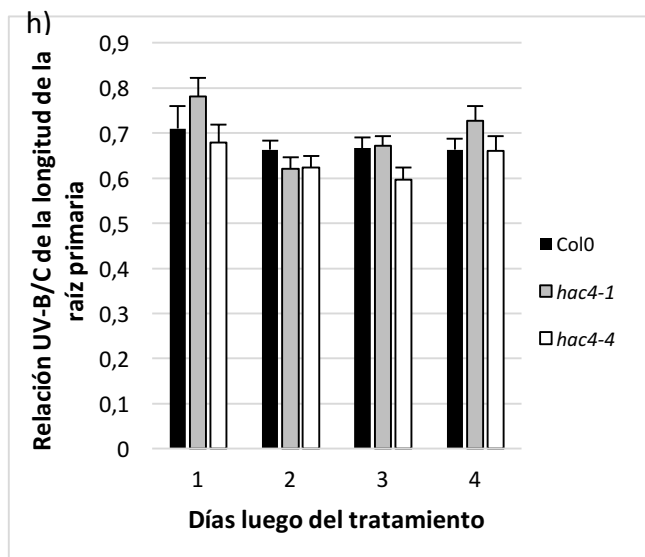
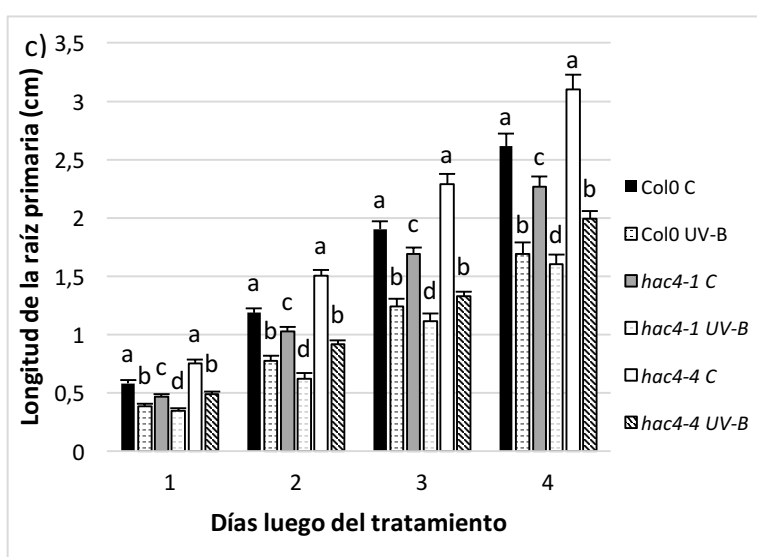
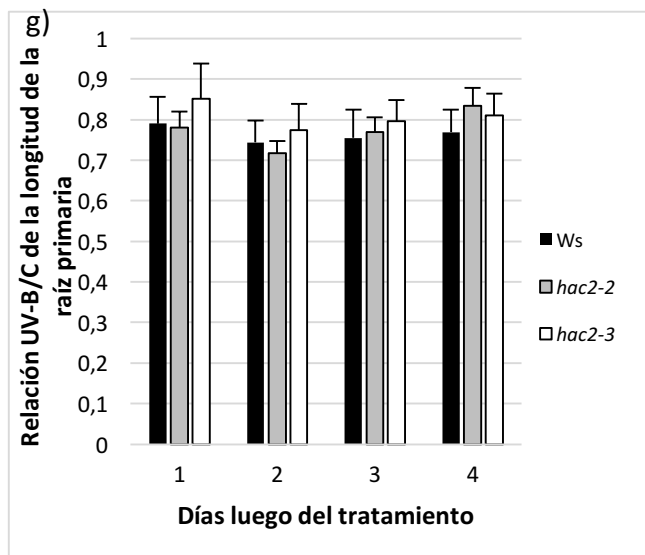
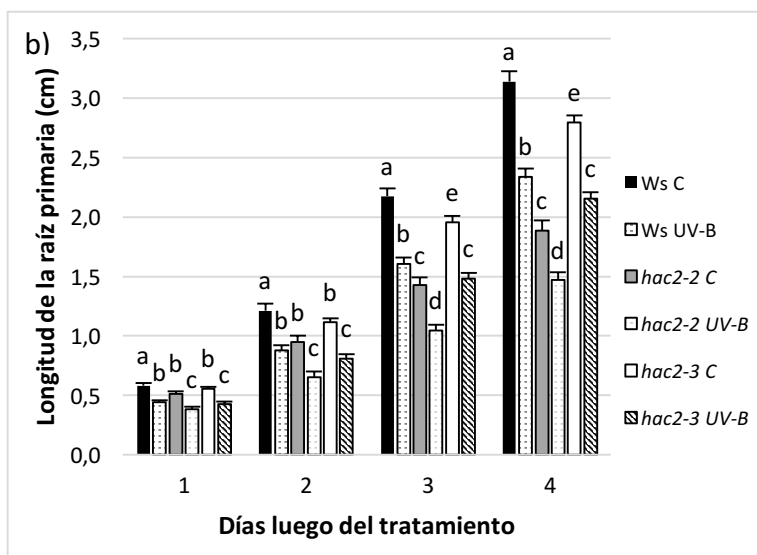
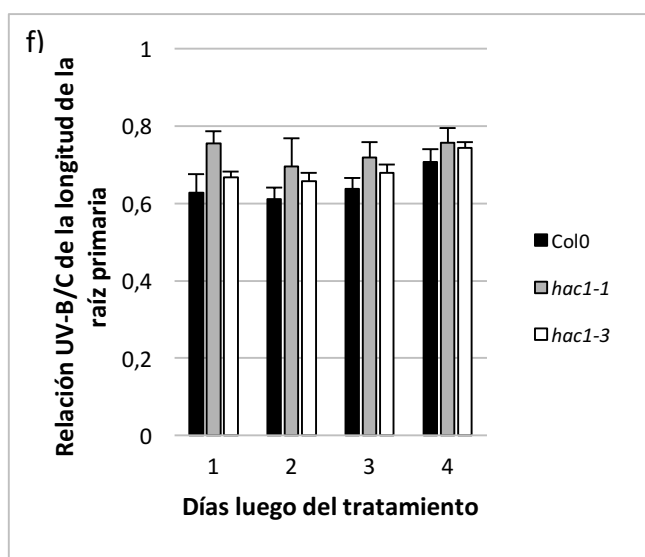
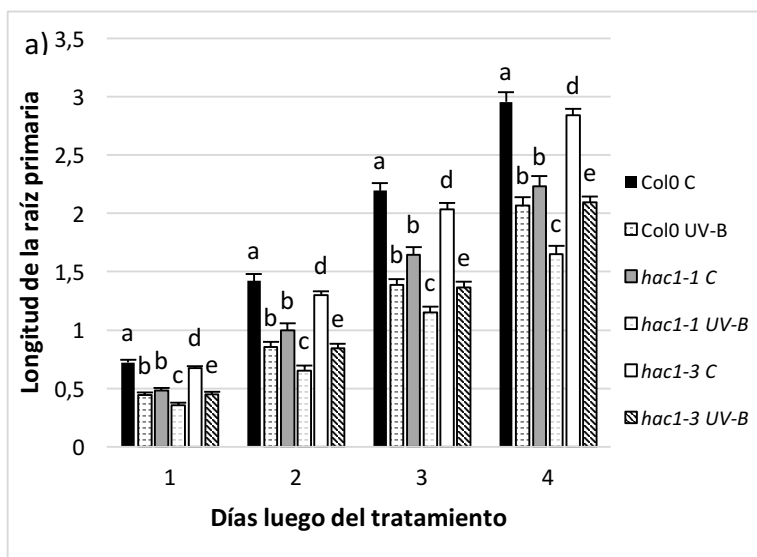


Figura 27. a) Área de la roseta de plantas *hac1*, *hac2*, *hac4*, *hac5*, *hac12* y salvajes tratadas con UV-B y no expuestas al UV-B o controles (C) medida cada 3 días luego de la germinación. Cada barra corresponde al promedio del área de la roseta de al menos 10 plantas y la barra de error corresponde al error estándar b) Área de la roseta de plantas expuestas al UV-B relativo a el de plantas control (UV-B/C) de mutantes *hac1*, *hac2*, *hac4*, *hac5*, *hac12* y plantas salvajes luego del tratamiento con radiación UV-B. Los experimentos fueron realizados por triplicado.



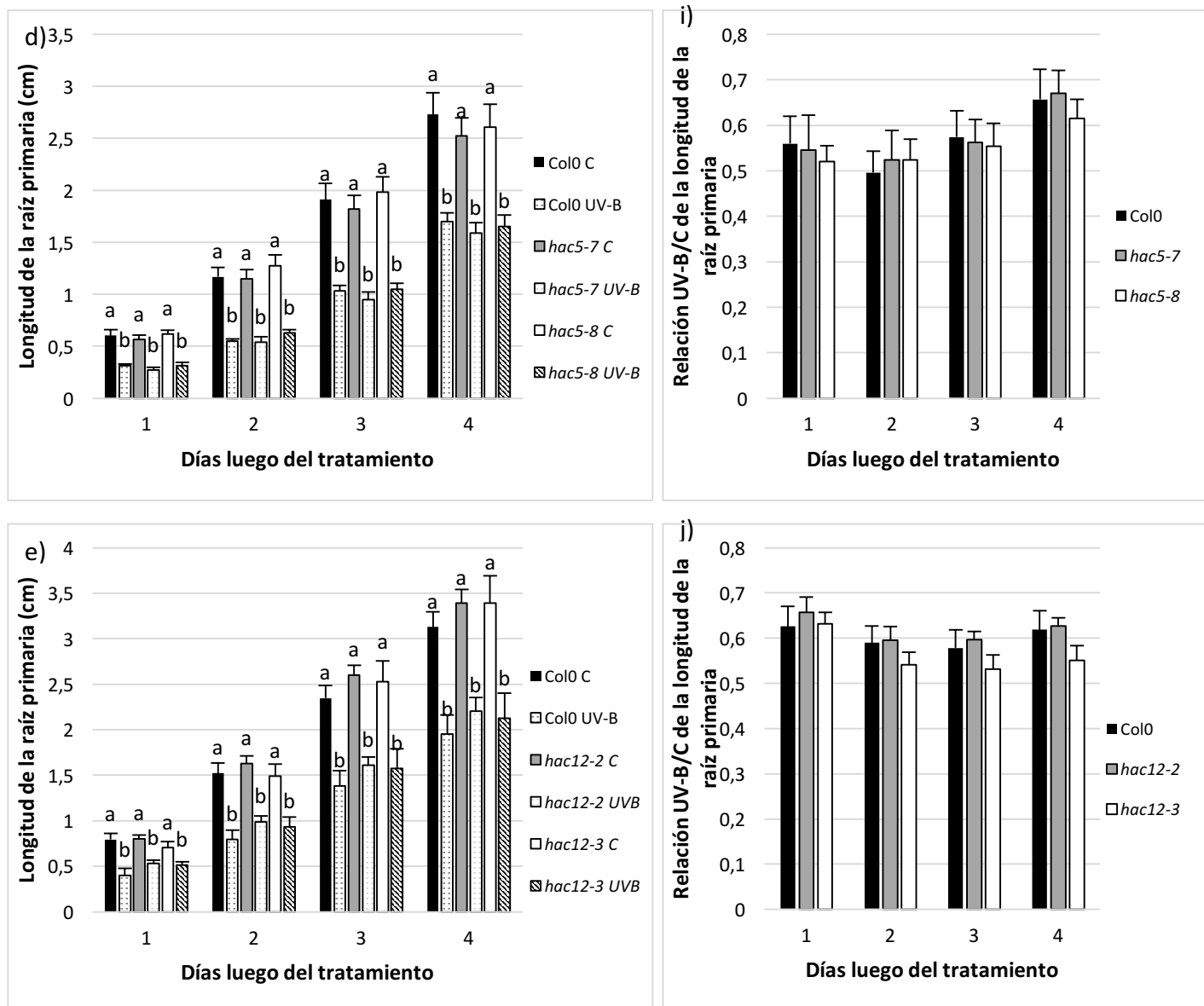


Figura 28. (a-e) Longitud de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B. Se midió la longitud de la raíz primaria de plantas a) *hac1*, b) *hac2*, c) *hac4*, d) *hac5*, e) *hac12* y de plantas salvajes luego de la irradiación con UV-B y en condiciones control (C). Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$. f-j) Longitud de la raíz primaria de plantas expuestas al UV-B relativa a la de plantas control (UV-B/C) de mutantes f) *hac1*, g) *hac2*, h) *hac4*, i) *hac5*, j) *hac12* y de plantas salvajes luego del tratamiento con radiación UV-B. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.4.2.4 Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 en la reparación del daño en el ADN inducido por UV-B

Por otra parte, se analizó la acumulación de dímeros de pirimidina por formación de un anillo de ciclobutano (DPCs) en plantas salvajes y en plantas deficientes en la expresión de cada uno de los genes *HAC* luego de la exposición con UV-B. Como puede observarse en la Figura 29, todas las plantas presentaron daño cuantificable luego del tratamiento con radiación UV-B, sin embargo ninguna de

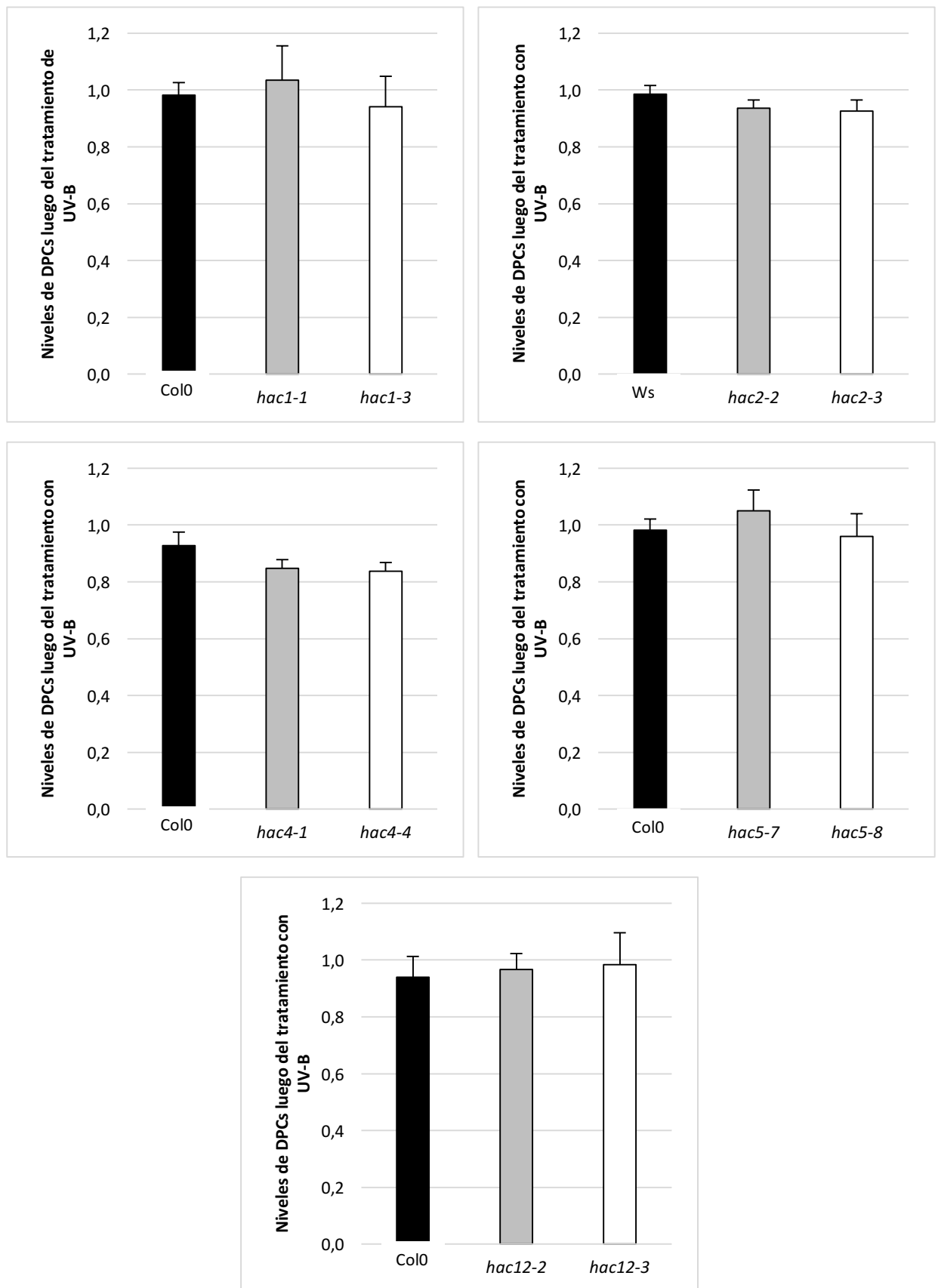


Figura 29. Análisis del daño en el ADN en plantas salvajes, mutantes y transgénicas de la familia CBP. Se muestran los valores de DPCs luego del tratamiento con UV-B. Las plantas control no presentaron daño cuantificable.

las plantas deficientes en la expresión de los genes *HAC* presentó diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes.

2.4.2.5 Efecto de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en las mutantes *hac1*, *hac5* y *hac12*

En las plantas, la floración es el proceso principal que marca el paso de la fase vegetativa a la fase reproductiva del desarrollo. Este proceso está estrechamente asociado con la estrategia reproductiva de las plantas y por lo tanto, diferentes especies de plantas poseen distintos tiempos de floración que han sido optimizados para garantizar el éxito reproductivo. Diversos estudios han identificado las principales vías que regulan la floración en *Arabidopsis*, entre las que se encuentran la vía del fotoperiodo, la ruta dependiente de giberelinas (GA), la vía autónoma y la vernalización. Las señales de inducción floral de estas cuatro vías principales de floración se transmiten a dos reguladores centrales denominados CO (del inglés “Constans”) y FLC (del inglés “Flowering locus C”) que regulan la floración de manera antagónica (Simpson y Dean, 2002; Boss y col., 2004; Lee y Lee, 2010).

FLC es un factor de transcripción de tipo caja MADS que bloquea la transición floral, en parte reprimiendo los integradores florales temporales SOC1 y FT (He y Amasino, 2005). La regulación de *FLC* es un ejemplo de cómo los sistemas modificadores de la cromatina pueden afectar el proceso de floración. Diversos estudios moleculares y genéticos han demostrado que la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 y la acetilación de las histonas están asociadas con la activación de la expresión de *FLC*, mientras que la desacetilación de las histonas y la trimetilación en las lisinas 9 y 27 están implicadas en la represión de *FLC* (He y Amasino, 2005). Como ya se mencionó en la Introducción, *HAC1*, *HAC5* y *HAC12*, que actúan en forma redundante, controlan la floración a través de la vía de regulación autónoma, afectando negativamente la expresión del principal represor floral *FLC* (Han y col., 2007).

Por otro lado, diversos estreses bióticos y abióticos alteran el tiempo de floración (Kazan y Lyons, 2016; Park y col., 2016). La salinidad, las temperaturas altas o bajas, la ausencia de nutrientes, la sequía o el exceso de agua son factores que influyen en el proceso de floración. Asimismo, los mecanismos de transducción de señal que desencadenan la respuesta de aclimatación frente a un determinado tipo de estrés convergen en las vías que inducen a la floración, ya sea en la del fotoperiodo, la vernalización, la mediada por giberelinas o la vía autónoma (Park y col., 2016). Además, un mismo tipo de estrés puede provocar tanto un adelanto como un retardo en el tiempo de la floración, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales (Park y col., 2016). En las plantas de *Arabidopsis*, las altas temperaturas,

la baja concentración de nitrato y la presencia de ácido salicílico y de EROs promueven la floración, mientras que la radiación UV-B la retrasa. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo ocurren los procesos involucrados en la regulación del tiempo de floración en situaciones de estrés (Park y col., 2016). Por lo tanto, para evaluar si las proteínas histona acetiltransferasas HAC1, HAC5 y HAC12 regulan el tiempo de floración en plantas expuestas al UV-B, plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *hac1-1*, *hac5-7* y *hac12-2* se sembraron en bandejas plásticas y se crecieron en ausencia de UV-B durante 9 días posteriores a la germinación. A partir del día 10, las

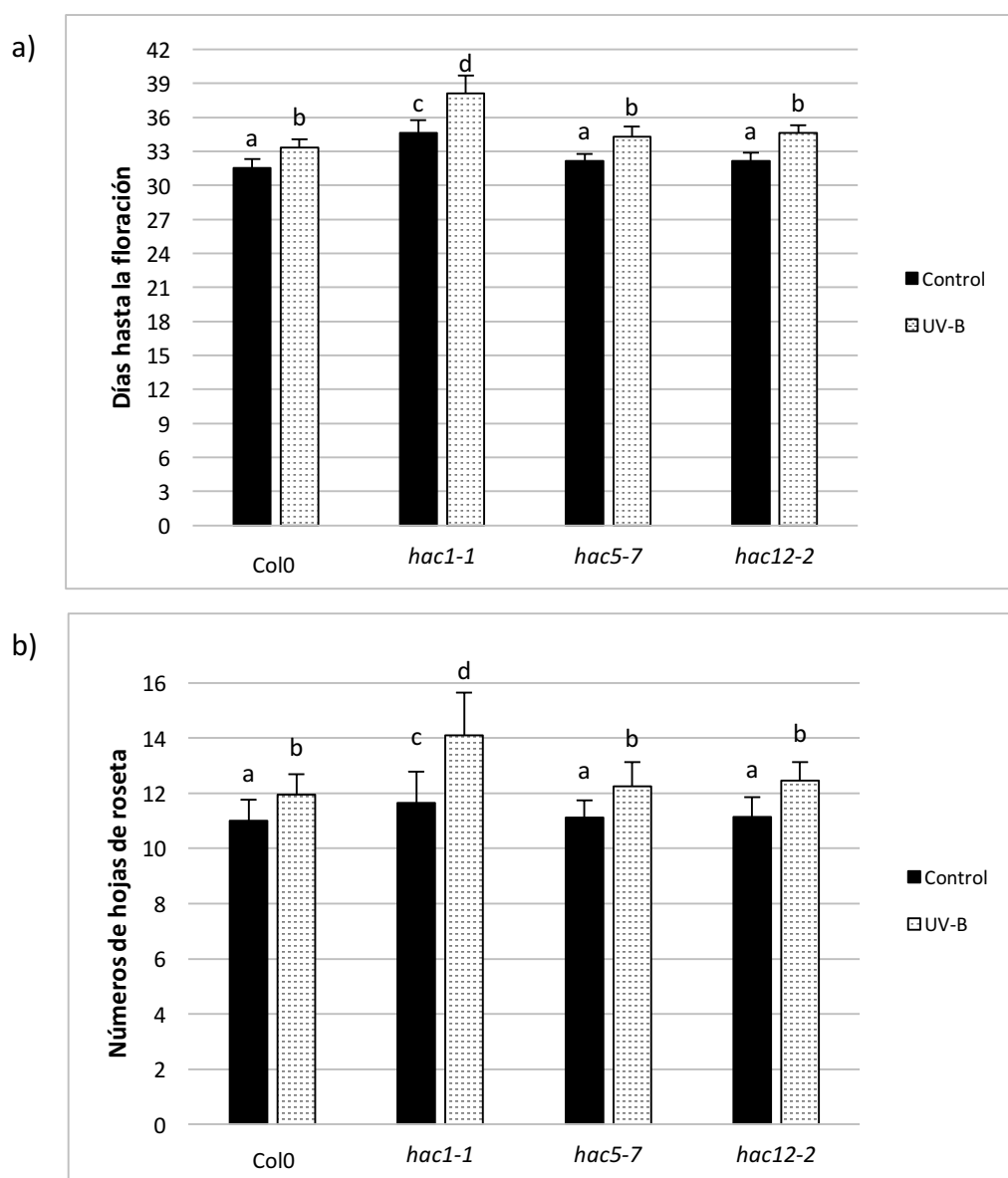


Figura 30. Tiempo de floración de las plantas salvajes Col0 y de las plantas mutantes *hac1-1*, *hac5-7* y *hac12-2*. a) Días desde la germinación de las plantas hasta la aparición de la primera flor en plantas expuestas al UV-B o mantenidas en condiciones control en ausencia de esta radiación. b) Número de hojas de roseta al momento de la floración en plantas expuestas al UV-B o mantenidas en condiciones control en ausencia de esta radiación. Cada barra corresponde al promedio de al menos 20 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar t de student con un $p < 0,05$.

plantas fueron tratadas diariamente con UV-B (2 W.m^{-2}) durante 1 h en el horario del mediodía, registrándose la cantidad de días que las plantas tardaron en florecer y la cantidad de hojas de roseta en el momento de la floración. Los resultados se muestran en la Figura 30, donde se puede observar que tanto las plantas mutantes como las plantas salvajes mostraron un retraso en el tiempo de floración luego de la exposición con radiación UV-B; sin embargo, mientras que las plantas mutantes *hac5-7* y *hac12-2* mostraron un retraso de la floración por UV-B similar al de las plantas salvajes, las plantas mutantes *hac1-1* presentaron un mayor retraso de la floración por UV-B (Figura 30b).

2.4.2.6 Análisis de la regulación de la expresión génica de enzimas que participan en la vía de floración

Para poder analizar las posibles causas del mayor retraso de la floración de las plantas *hac1* expuestas a la radiación UV-B, la expresión de transcritos *FLC* y *SOC1* fue analizada en plantas salvajes y *hac1-1* en condiciones control y UV-B. Para ello, se utilizó ARN de muestras de hojas de plantas salvajes y deficientes en la expresión del gen *HAC1*, tanto de plantas expuestas como no expuestas a la radiación UV-B (plantas control). Para llevar a cabo dicho objetivo, las plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *hac1-1* se sembraron en bandejas plásticas y se crecieron en ausencia de UV-B durante 9 días posteriores a la germinación. A partir del día 10, las plantas fueron tratadas diariamente con radiación UV-B (2 W.m^{-2}) durante 1 h en el horario del mediodía. Al noveno día de exposición con UV-B se juntaron las hojas de plantas

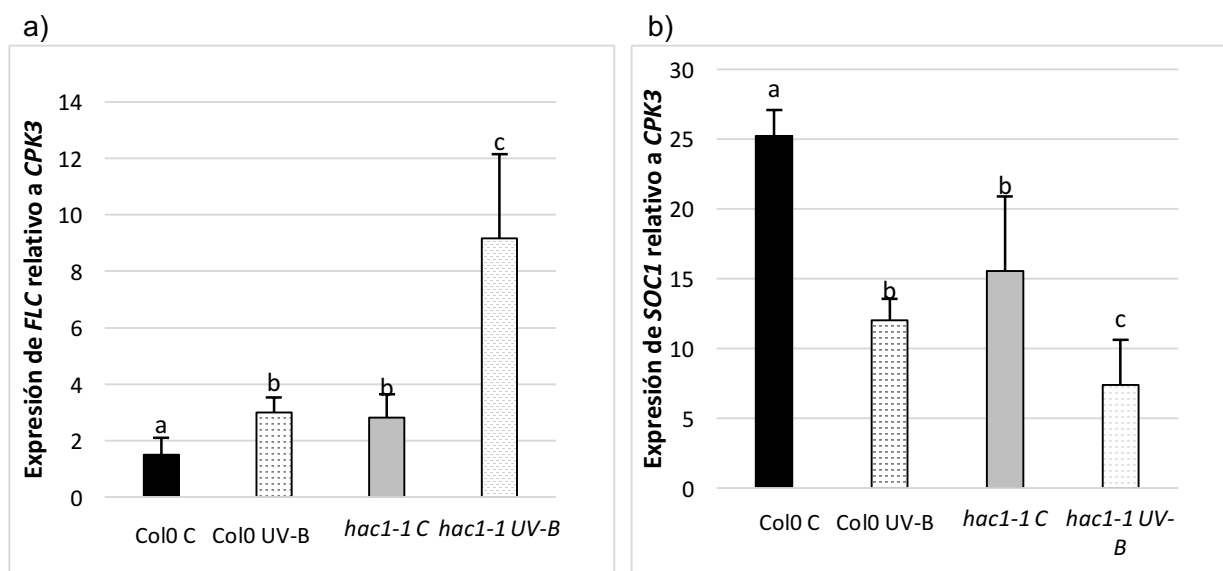


Figura 31: Medida de la expresión de a) *FLC* y b) *SOC1* en plantas *hac1-1* y en plantas salvajes. Análisis por RT-PCR cuantitativa del nivel relativo de expresión de los transcritos seleccionados en plantas mutantes *hac1-1* y *Col0*, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B. Para la normalización de los datos se amplificó el transcrito del gen *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

salvajes y mutantes *hac1-1* considerando que las plantas en ese momento se encontraban finalizando el desarrollo vegetativo.

Los resultados obtenidos demuestran que tanto las plantas salvajes como las mutantes *hac1-1* aumentan los niveles de *FLC* y disminuyen los niveles de *SOC1* luego del tratamiento con UV-B, lo cual se correlaciona directamente con el retraso en la floración observado (Figura 31). Además, las plantas mutantes *hac1-1* mostraron mayores niveles de *FLC* y menores niveles de *SOC1* en condiciones control, lo que permitiría explicar el retraso de la floración de las mutantes *hac1-1* en dichas condiciones. Por otro lado, las plantas *hac1-1* expuestas al UV-B presentaron niveles significativamente mayores de *FLC* y significativamente menores de *SOC1* que las plantas salvajes, lo que podría explicar el mayor retraso en la floración de dichas plantas en estas condiciones.

2.4.2.7 Discusión y conclusiones

En esta parte del capítulo analizamos la participación de las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 (*HAC1*, *HAC2*, *HAC4*, *HAC5* y *HAC12*) en distintas respuestas a la radiación UV-B en *Arabidopsis*.

En primer lugar se realizó una caracterización fenotípica del área de la roseta de plantas de *Arabidopsis* salvajes del ecotipo Col0 para su comparación con el de plantas *hac1*, *hac2*, *hac4*, *hac5* y *hac12*, tanto en condiciones control en ausencia de UV-B como luego de un tratamiento con UV-B, utilizando dos líneas mutantes independientes en cada gen. Como fue descrito anteriormente, las plantas dobles mutantes *hac1 hac5* y *hac1 hac12* son más chicas que las plantas salvajes y este fenotipo no fue observado para ninguna de las mutantes simples (Han y col., 2007). Consistentemente, en nuestro trabajo no observamos diferencias significativas entre las plantas mutantes y transgénicas simples en cada uno de los genes y las plantas salvajes en condiciones control. Además, luego del tratamiento con UV-B, el área de la roseta de todas las plantas disminuyó significativamente. Sin embargo, la disminución del área de la roseta por esta radiación en plantas salvajes y plantas *hac1*, *hac2*, *hac4*, *hac5* y *hac12* fue similar, sin mostrar diferencias significativas entre todos los grupos de plantas.

En segundo lugar, se analizó la longitud de la raíz primaria de todas las plantas deficientes en las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300, tanto en condiciones control en ausencia de UV-B como luego del tratamiento con UV-B. Las plantas *hac1* en condiciones control presentaron un retraso en el crecimiento de la raíz primaria, al igual de lo previamente reportado por Deng y col., (2007). Las plantas *hac2* y *hac4-1* también presentaron un retraso en el crecimiento de la raíz en

condiciones control; sin embargo, a pesar de las diferencias observadas en estas condiciones, ninguna de las plantas mutantes simples y transgénicas presentó diferencias en la inhibición de la raíz primaria por UV-B con respecto a las plantas salvajes. Varios trabajos indican que *HAC1*, *HAC5* y *HAC12* actúan sinérgicamente, sin embargo *HAC1* posee un rol predominante, seguido de *HAC5*. Por otra parte, *HAC4* tendría un papel negativo frente a la actividad de las otras HACs, ya que su presencia contrarrestó varios fenotipos observados en las dobles mutantes *hac1 hac5* (Deng y col., 2007; Han y col., 2007; Li y col., 2014). Por lo tanto, dada su redundancia funcional, es posible que en las mutantes simples en cada uno de estos genes, la deficiencia en alguno de ellos pueda ser suplida por otro gen funcional. De esta manera, no se puede descartar que múltiples mutantes en los genes *hac* podrían mostrar diferencias en estas respuestas frente a la radiación UV-B con las mutantes simples y las plantas salvajes, como ya se ha reportado para otros fenotipos descritos (Han y col., 2007; Li y col., 2014).

Además, se midieron los niveles de DPCs en todas las plantas deficientes en las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 luego del tratamiento con UV-B debido a que, como se expuso anteriormente, la formación de DPCs es uno de los daños mayoritarios causados por la radiación UV-B (Jansen y col., 1998; Rastogi y col., 2010; Parihar y col., 2015). Todas las mutantes *hac* presentaron niveles de daño en el ADN por UV-B similares a los de las plantas salvajes en las condiciones ensayadas, por lo que las histonas acetiltransferasas de la familia CBP/p300 no participarían en la respuesta al daño en el ADN por UV-B en *Arabidopsis*, aunque, de manera similar a lo expuesto en el párrafo anterior, dada la redundancia funcional de estas proteínas, es posible que en las mutantes simples la deficiencia en alguna de ellas pueda ser suplida por el producto de otro gen funcional.

Por último, se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en las plantas de *Arabidopsis* mutantes *hac1*, *hac5* y *hac12*, debido a que previamente había sido reportado que *HAC1*, *HAC5* y *HAC12* controlan el tiempo de floración, afectando negativa e indirectamente la expresión del principal represor floral FLC (Han y col., 2007). De esta manera, estas HACs afectarían la expresión de FLC por medio de la acetilación de reguladores transcripcionales de FLC (Han y col., 2007). En las condiciones ensayadas, las plantas *hac1* presentaron un mayor retraso de la floración en presencia de UV-B con respecto al medido en las plantas salvajes Col0, mientras que las plantas *hac5* y *hac12* presentaron un retraso de la floración por UV-B similar al de plantas salvajes. Debido a que *HAC1* afecta negativamente la expresión de dicho gen, se midieron los niveles de expresión de *FLC*, los cuales fueron significativamente mayores en plantas *hac1* que en plantas salvajes en condiciones

control. Además, en plantas expuestas a la radiación UV-B los niveles de *FLC* aumentaron aún más que en las plantas mutantes. Por otra parte, los niveles de *SOC1* medidos en las plantas mutantes *hac1* resultaron menores a los de las plantas salvajes en condiciones control y disminuyeron aún más en las plantas expuestas a la radiación UV-B. En conjunto, estos resultados permitirían explicar, al menos en parte, el mayor retraso de la floración observado en las plantas *hac1*.

Como conclusión, las histonas acetiltransferasas HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12 no estarían involucradas en las respuestas al UV-B en las condiciones ensayadas en este trabajo de Tesis; sin embargo, teniendo en cuenta que algunas de estas proteínas tienen actividad redundante, su efecto podría estar suplido por la presencia de alguna proteína de la misma familia. Con respecto a HAC1, los resultados demuestran que esta proteína regula el tiempo de floración en respuesta a la radiación UV-B en *Arabidopsis*, mediante la regulación de la expresión de *FLC* y *SOC1*.

2.4.3 Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia TAF_{II}250 en las respuestas a la radiación UV-B

TAF_{II}250, también llamado TAF1, es uno de los 15 factores asociados a la proteína de unión a TATA (TBP) que forman el complejo TFIID, un factor de transcripción general que pertenece al complejo de pre-iniciación de la ARN polimerasa II. La proteína TAF1 se encuentra conservada en los organismos eucariotas y es esencial para la función del complejo TFIID (Wassarman y Sauer, 2001). A diferencia de otros organismos que tienen un solo miembro de esta familia, *Arabidopsis thaliana* posee dos miembros, HAF1 y HAF2. Estas proteínas, de 1919 y 1786 aminoácidos, respectivamente, tienen un 74% de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos y poseen dominios particulares tales como: (1) un dominio HAT de tipo TAF_{II}250 localizado en la región central de la proteína, (2) un bromodominio en el extremo C terminal, y (3) un dominio ubiquitina en el extremo amino del dominio HAT (Pandey y col., 2002). En particular, la proteína HAF1 se encuentra asociada a la proteína TBP (proteína de unión a TATA) (Figura 32, Lawit y col., 2007).



Figura 32: Dominios proteicos de HAF1 y HAF2. TBP: Proteína de unión a TATA; UBQ: Dominio ubiquitina; BRD: bromodominio. Adaptado de la base de datos Pfam.

En *Arabidopsis*, los genes codificantes para las dos proteínas tienen diferente patrón de expresión; mientras que los dos genes tienen baja expresión en las hojas de la roseta vegetativa, *HAF1* exhibe una mayor expresión en las semillas secas y *HAF2* en el polen (Figura 33).

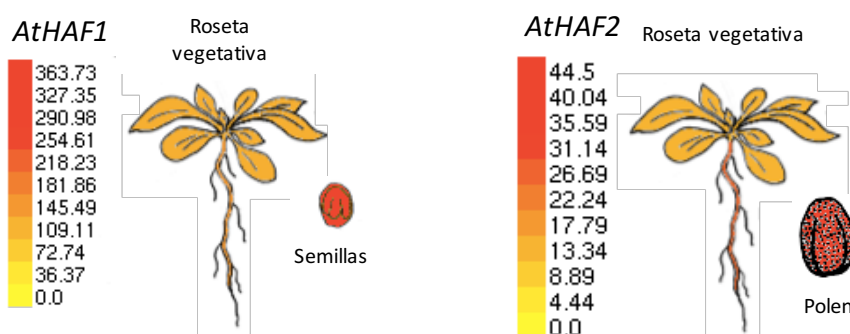


Figura 33: Patrón de expresión de los genes *HAF1* y *HAF2* en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de *Arabidopsis* eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

Estudios genéticos realizados en *Arabidopsis* demostraron que HAF2 interacciona con GCN5 (o HAG1) para integrar las señales lumínicas y acetilar las regiones promotoras de los genes inducidos por luz. Ambas proteínas son requeridas

para la acetilación de H3K9, H3K27 y H4K12 en los promotores de los genes diana. Además, las plantas de *Arabidopsis* dobles mutantes en los genes *HAF2* y *HY5* muestran un efecto sinérgico en lo que respecta a la longitud del hipocótilo y la expresión de los genes inducidos por luz por diferentes longitudes de onda. Esto sugiere que *HAF2* interacciona también con *HY5* para activar la expresión de los genes de respuesta a la luz (Bertrand y col., 2005; Benhamed y col., 2006).

Por otra parte, estudios realizados utilizando plantas mutantes *haf1* demostraron que *HAF1* es un gen esencial para la viabilidad y la fertilidad de *Arabidopsis* y que no es redundante a la función de *HAF2* (Waterworth y col., 2015). Además, las plantas mutantes *haf1-3*, que expresan el transcritto de *HAF1* sin el bromodominio, exhiben una hipersensibilidad a genotoxinas que provocan rupturas de doble hebra y entrecruzamiento en el ADN, pero no a otras formas de estrés abiótico como el estrés salino y osmótico. Estos estudios sugieren que esta proteína es importante para la resistencia de las plantas al estrés genotóxico debido a que el bromodominio de *HAF1* interacciona con la proteína MRE11, la cual participa en la reparación de rupturas doble hebra en el ADN (Waterworth y col., 2015).

2.4.3.1 Regulación de la expresión de las histonas acetiltransferasas de la familia TAF_{II}250 por la radiación UV-B

En primer lugar se analizó si la expresión de los genes que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia TAF_{II}250 son regulados por la radiación UV-B en plantas salvajes de *Arabidopsis*. Para ello se midieron por RT-PCR cuantitativa los niveles de los transcritos de los genes en estudio en hojas de *Arabidopsis* Col0, tanto después de un tratamiento con UV-B durante 4 h como en condiciones control en ausencia de UV-B. La Figura 34 muestra que no hay cambios significativos en los niveles de expresión del gen *HAF2* en plantas salvajes crecidas en condiciones control con respecto a los niveles presentes en plantas expuestas al UV-B, mientras que los niveles del transcritto *HAF1* disminuyen significativamente luego del tratamiento con UV-B.

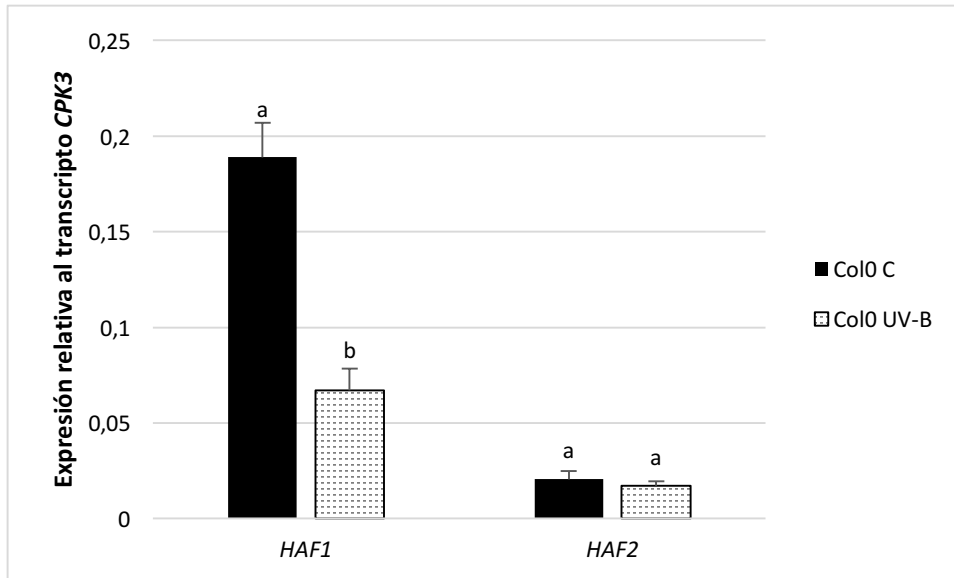


Figura 34: Niveles de los transcriptos que codifican para histonas acetiltransferasas de la familia TAF_{II}250. Los niveles de transcriptos *HAF1* y *HAF2* se midieron en plantas crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B y luego de la exposición con radiación UV-B por 4 h en plantas de *Arabidopsis* Col0. Las barras de error corresponden a los errores estándar y las letras muestran diferencias significativas para cada transcripto, al aplicar t de student con un $p < 0,05$. Para la normalización de los datos se utilizó el transcrito del gen *CPK3*.

2.4.3.2 Identificación de plantas de *A. thaliana* deficientes en la expresión de los genes de la familia TAF_{II}250

Para realizar el trabajo experimental se utilizaron plantas de *Arabidopsis* que presentan una supresión o disminución en la expresión de las dos histonas acetiltransferasas *HAF1* y *HAF2*. Para ello se utilizó una línea de plantas transgénicas con disminución en los niveles de *HAF1* por expresión de un ARN de interferencia para el gen y una línea de plantas mutantes por inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en el gen *HAF1*, y dos líneas mutantes por inserción del ADN-T en el gen *HAF2*. Las líneas utilizadas se detallan en materiales y métodos.

2.4.3.2.1 Identificación de plantas *A. thaliana* deficientes en los genes de la familia TAF_{II}250

Al igual que las plantas mutantes de las otras familias, las plantas homocigotas mutantes para los genes *HAF1* y *HAF2* se identificaron mediante PCR. En la Figura 35b se muestra que la planta número 5 (calle 5) de la línea *haf1-3* contiene la inserción del ADN-T en ambos alelos del gen *HAF1* ya que presenta amplificación negativa utilizando el par de cebadores HAF1-3 L y HAF1-3 R (cebadores que flanquean la región de inserción del ADN-T) y muestra amplificación positiva utilizando un cebador que hibrida en un extremo del ADN-T (LB SALK) y otro en la secuencia del gen *HAF1* (HAF1-3 L) (Figura 35b), por lo tanto, esta planta es mutante homocigota en *HAF1*. Además, en la Figura 35c se puede observar que una planta salvaje Col0 (calle número 12, WT) muestra una reacción de PCR positiva con los oligonucleótidos HAF1-3 L y HAF1-3 R, y una reacción de PCR negativa utilizando los cebadores LB SALK-

HAF1-3 L, debido a que el ADN-T no se encuentra insertado en esa región. Una vez identificadas las plantas mutantes homocigotas, se evaluó por RT-PCR la expresión del gen en estudio en estas plantas. En la Figura 35d se puede observar que no se detecta el transcripto *HAF1* en la planta número 2 (calle 2).

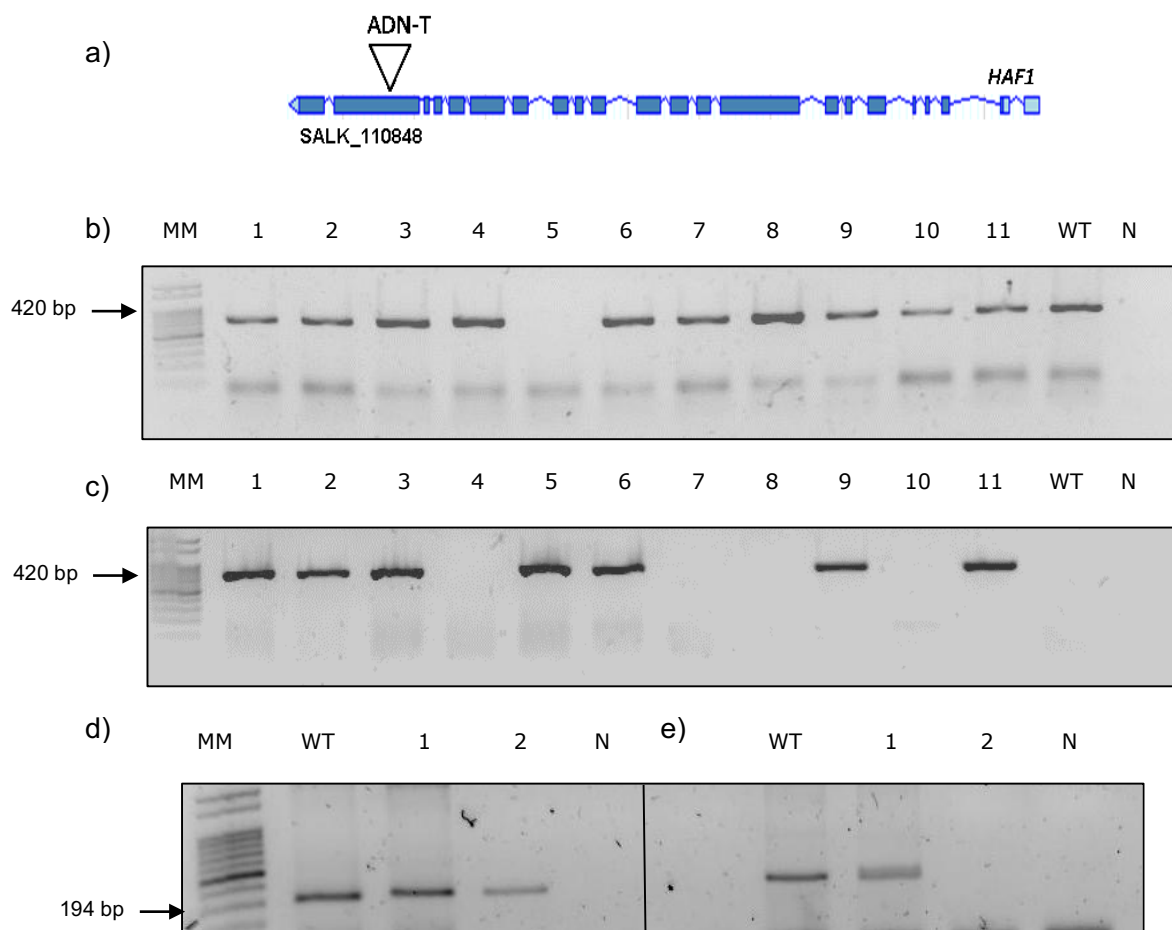


Figura 35. Ejemplo de la selección de las plantas mutantes homocigotas *haf1-3* mediante el análisis de los productos de PCR en electroforesis en geles de agarosa. a) Esquema del gen *HAF1* de Arabidopsis. El triángulo indica el sitio de inserción del ADN-T. b) Reacción de PCR a partir de ADN genómico de 11 plantas *haf1-3* utilizando los cebadores HAF1-3 L - HAF1-3 R. c) Reacción de PCR a partir de ADN genómico de 11 plantas *haf1-3* utilizando los cebadores LB SALK - HAF1-3 L. d) y e) RT-PCR a partir de ADNc de 2 plantas homocigotas *haf1-3* utilizando los cebadores L10A R - L10A L y *HAF1*RNAm L - *HAF1*RNAm R, respectivamente. Referencias: MM, marcadores de masa molecular; 1-11, muestras de plantas mutantes *haf1*; WT, muestra de una planta salvaje Col0; N, control negativo de la PCR. Las calles 1 a 11 representan las muestras de plantas.

De manera similar, en la Figura 36 se muestra la identificación de plantas mutantes homocigotas para el gen *HAF2*.

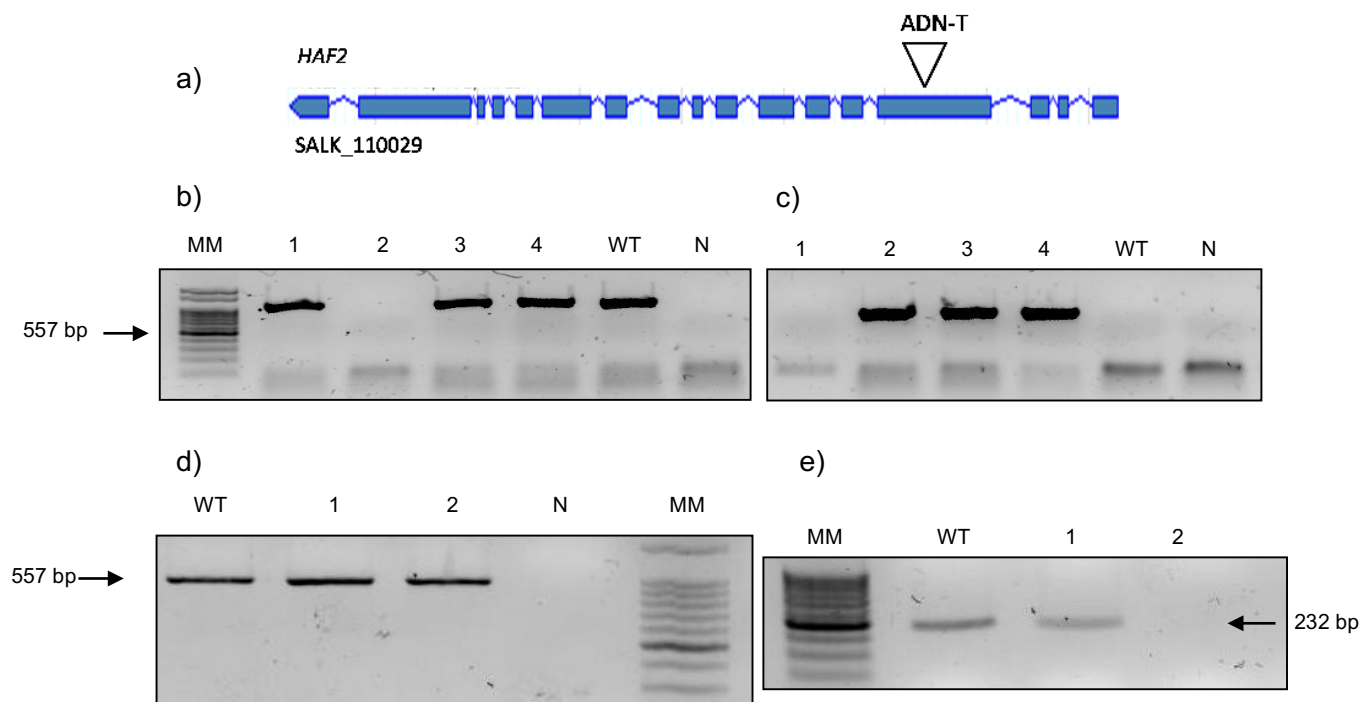


Figura 36. Ejemplo de la selección de las plantas mutantes homocigotas *haf2-3* mediante el análisis de los productos de PCR en electroforesis en geles de agarosa. a) Esquema del gen *HAF2* de Arabidopsis. El triángulo indica el sitio de inserción del ADN-T. b) Reacción de PCR a partir de ADN genómico de 4 plantas *haf2-3* utilizando los cebadores HAF2-3 L - HAF2-3 R. c) Reacción de PCR a partir de ADN genómico de 4 plantas *haf2-3* utilizando los cebadores LB SALK - HAF2-3 L. d) y e) RT-PCR a partir de ADNc de 2 plantas *haf2-3* utilizando los primers L10 R - L10 L y *HAF2RNAm* L - *HAF2RNAm* R, respectivamente. Referencias: MM, marcadores de masa molecular; 1-4, muestras de *haf2*; WT, muestra de planta salvaje; N, control negativo de la PCR.

Por otro lado, las plantas transgénicas *haf1-4* se seleccionaron en base a su resistencia a BASTA, impregnando las hojas directamente con el herbicida. Como control se utilizaron plantas salvajes Ws, las cuales detuvieron su crecimiento luego de la aplicación del herbicida debido a que no poseen la resistencia. Posteriormente, se utilizaron las plantas resistentes al herbicida para determinar los niveles de expresión del gen de interés por RT-PCR en tiempo real con el objetivo de verificar que se encuentre disminuida su expresión. A modo de ejemplo en la Figura 37 se muestra la disminución de los niveles de expresión *HAF1* en plantas transgénicas *haf1-4* con respecto a las plantas salvajes Ws.

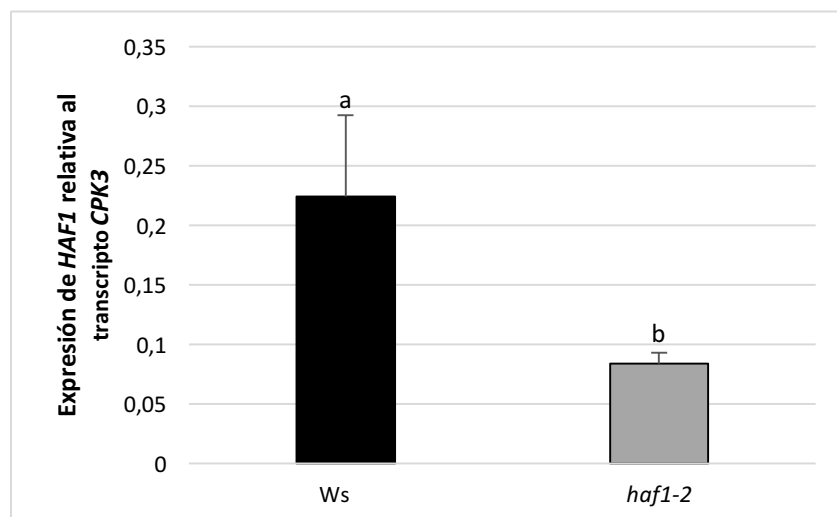


Figura 37. Expresión de *HAF1* en plantas transgénicas *haf1-2* y en plantas salvajes Ws relativa a *CPK3*. Las barras de error corresponden al error estándar. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar t de student con un $p < 0,05$.

2.4.3.3 Rol de las histonas acetiltransferasas de la familia TAFII250 en la reparación del daño en el ADN inducido por el UV-B

De manera similar a lo estudiado para los miembros de la familia GNAT y CBP/p300, se analizó la acumulación DPCs en las plantas salvajes y en las plantas deficientes en la expresión de cada uno de los genes *HAF* luego de finalizado el tratamiento con la radiación UV-B. Tanto las plantas mutantes *haf1-3* (Figura 38a), *haf2-3* y *haf2-4* (Figura 38c), las plantas transgénicas *haf1-4* (Figura 38b) y las plantas salvajes Col0 y Ws mostraron niveles similares de daño en el ADN luego del tratamiento con UV-B.

2.4.3.4 Caracterización fenotípica de plantas deficientes en la expresión de histonas acetiltransferasas expuestas a la radiación UV-B

2.4.3.4.1 Efecto de la radiación UV-B en la elongación de la raíz primaria

Para la caracterización fenotípica de las plantas deficientes en la expresión de los genes *HAF* frente al UV-B, analizamos el efecto de esta radiación en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. Tanto las plantas salvajes como las plantas *haf1-3*, *haf1-4*, *haf2-3* y *haf2-4* presentaron una inhibición del crecimiento de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B (Figura 39). Además, en condiciones control, las plantas *haf1-3* y *haf1-4* presentaron una longitud de la raíz significativamente menor que la de las plantas salvajes, mientras que luego del tratamiento con UV-B estas plántulas mostraron una raíz primaria con similar longitud que la de las plantas salvajes. Por lo tanto, los resultados indican que las plantas *haf1* muestran una menor inhibición del crecimiento de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B que las plantas salvajes (Figuras 39d y e). A diferencia de lo observado para *haf1*, las plantas

haf2 mostraron un fenotipo de inhibición de la raíz primaria por UV-B similar al de las plantas salvajes (Figura 39f).

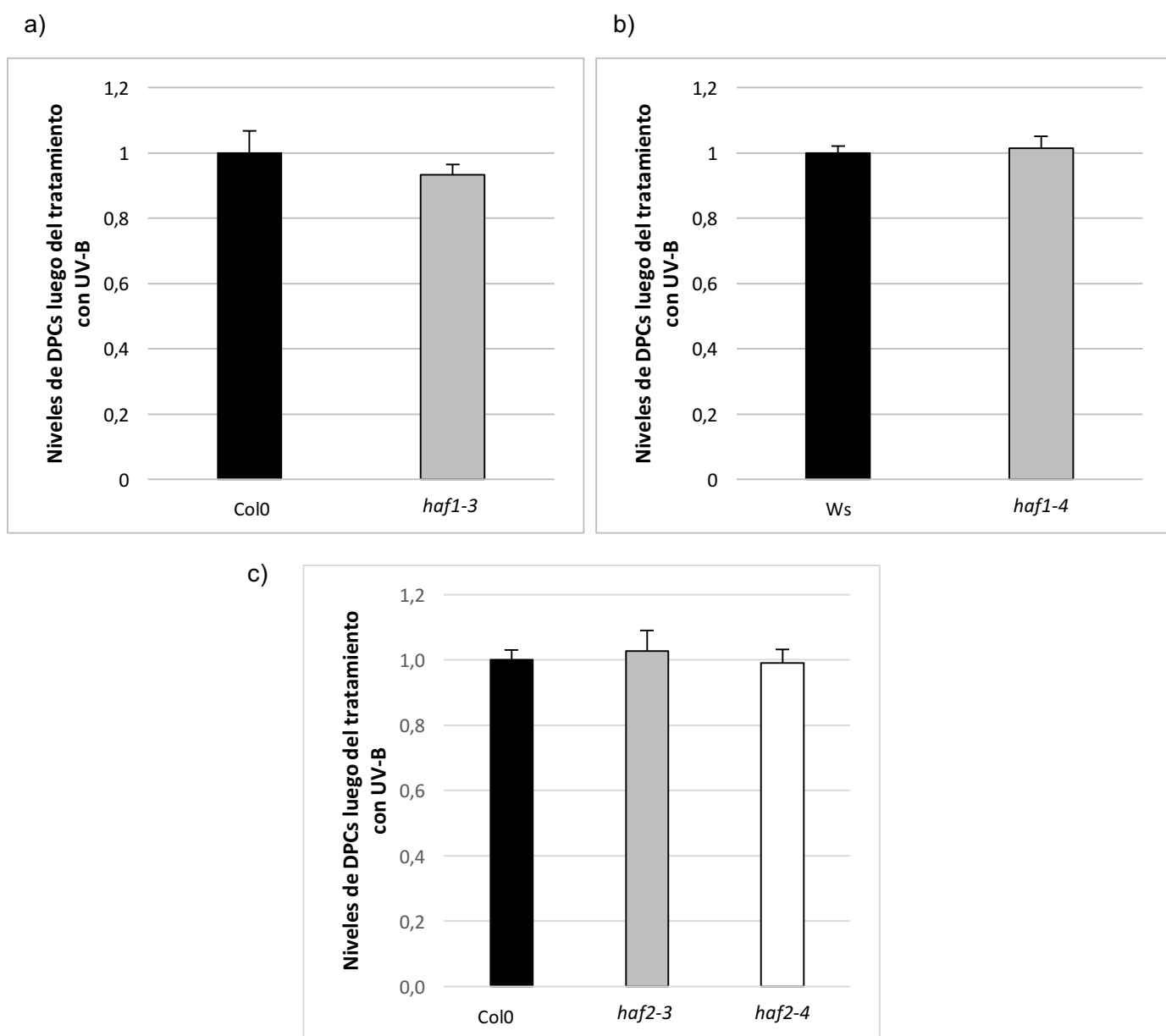


Figura 38. Análisis del daño en el ADN en las plantas salvajes, mutantes y transgénicas de la familia TAFII250. Se muestran los niveles de DPCs luego del tratamiento con UV-B de las plantas a) *haf1-3* y Col0, b) *haf1-4* y Ws y c) *haf2-3*, *haf2-4* y Col0. Las plantas control no presentaron daño cuantificable. Cada barra corresponde al promedio de 6 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados similares.

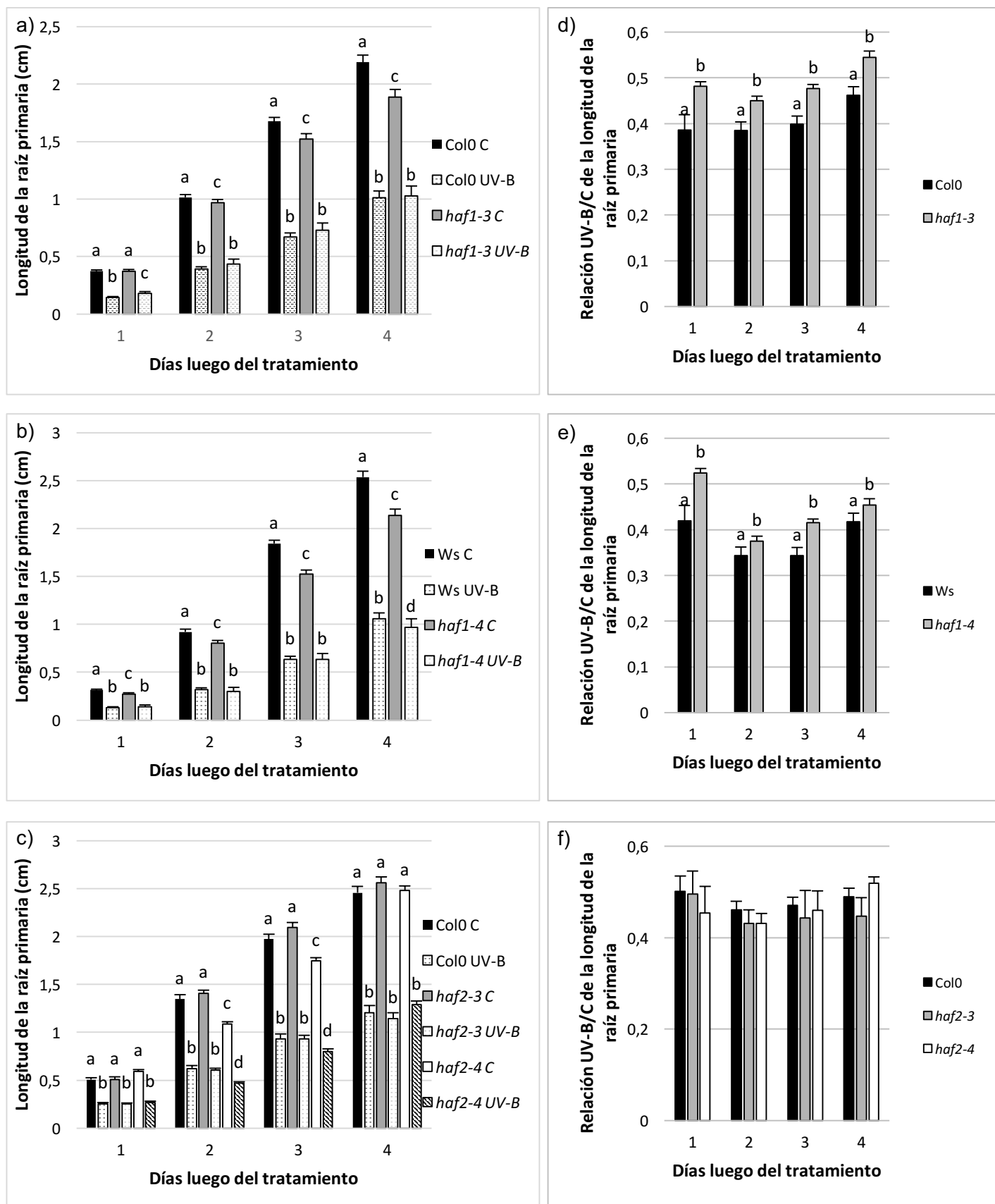


Figura 39. Elongación de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B. Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas salvajes, *haf1-3*, *haf1-4*, *haf2-3* y *haf2-4* tanto en condiciones control como luego de la irradiación con UV-B. a) b) y c) Longitud de la raíz en función de los días luego del tratamiento y en d) e) y f) la relación UV-B/C del grado de elongación de la raíz en función de los días luego del tratamiento para *haf1-3*, *haf1-4* y *haf2-3* y *haf2-4*, respectivamente. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0.05$.

2.4.3.4.2 Efecto de la radiación UV-B sobre el área de la roseta

A continuación se comparó el crecimiento de las hojas de las plantas salvajes con el de las plantas mutantes *haf1-3*, *haf1-4*, *haf2-3* y *haf2-4*, antes y después del tratamiento con UV-B, de manera similar a lo analizado para las otras dos familias de histonas acetiltransferasas.

Los resultados obtenidos demuestran que todas las plantas disminuyen su tamaño luego del tratamiento con UV-B (Figura 40). Por otro lado, en condiciones control, el área de las rosetas de las plantas *haf1-3* y *haf1-4* fue menor que el de las plantas salvajes (Figura 40 a y b), demostrando que esta proteína podría tener un rol en el desarrollo de las plantas. Luego del tratamiento con UV-B, tanto las plantas *haf1* como las plantas *haf2* presentaron un área similar al de las plantas salvajes (Figuras 40 a, b y c); por lo tanto, mientras que las plantas *haf2-3* y *haf2-4* presentaron una inhibición del crecimiento de la roseta por UV-B similar a la de las plantas salvajes (Figuras 40 f), las plantas *haf1-3* y *haf1-4* mostraron una menor inhibición del crecimiento de la roseta que las plantas salvajes expuestas al UV-B (Figura 40 d y e).

Por otra parte, y de manera similar a lo analizado para las mutantes *hag3* en el Capítulo 2.4, se investigó si el fenotipo de inhibición del crecimiento de la roseta por UV-B de plantas *haf1* se correlacionaba con una disminución en el área de la hoja #5 de estas plantas, que se encontraba en proliferación activa al momento del tratamiento.

Los resultados demostraron que, en condiciones control, el área de la hoja #5 de las plantas *haf1-3* fue menor al de las plantas salvajes porque tienen un menor área celular que el de las hojas de las plantas salvajes (Figura 41 a y c). Luego del tratamiento con radiación UV-B, el área de la hoja #5 de ambas plantas fue similar (Figura 41a), debido a que, a pesar de que luego del tratamiento con UV-B ambas plantas mostraron una similar inhibición de la proliferación celular, las plantas mutantes *haf1-3* mostraron un incremento en el área celular (Figura 41c), sugiriendo que un efecto de compensación estaría ocurriendo en las plantas mutantes luego del tratamiento con UV-B.

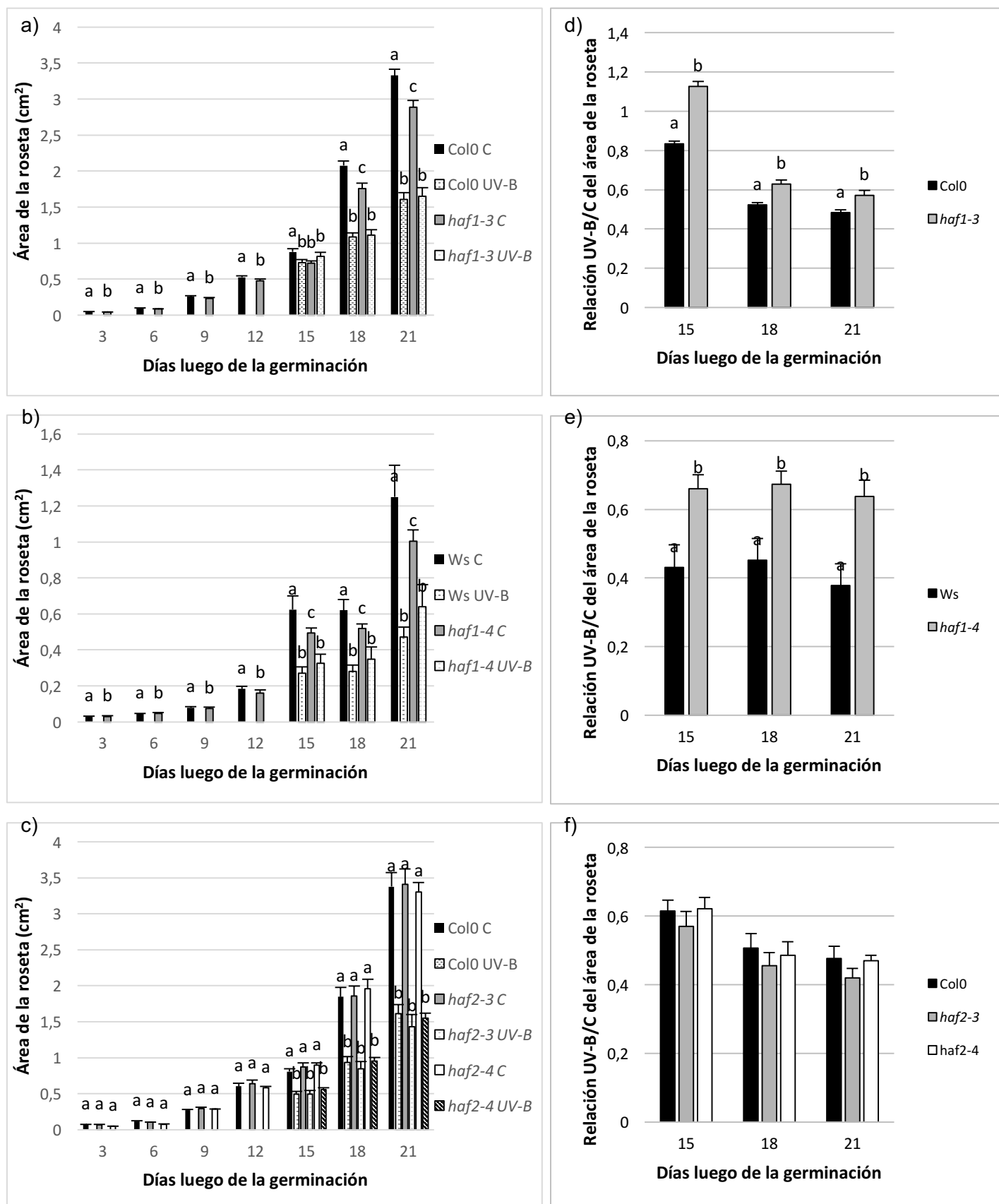


Figura 40. Efecto de la radiación UV-B sobre el área de la roseta. Se muestra el área de la roseta (cm²) de plantas salvajes y a) *haf1-3*, b) *haf1-4*, c) *haf2-3* y *haf2-4* tratadas (UV-B) y controles (C) medidas cada 3 días luego de la germinación. Cada barra corresponde al promedio del área de la roseta de al menos 6 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. c, d y f) Área relativa (UV-B/C) de plantas *haf1-3*, *haf1-4*, *haf2-3*, *haf2-4* y de plantas salvajes luego del tratamiento con radiación UV-B. Las letras muestran diferencias significativas para cada día, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$. Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados similares.

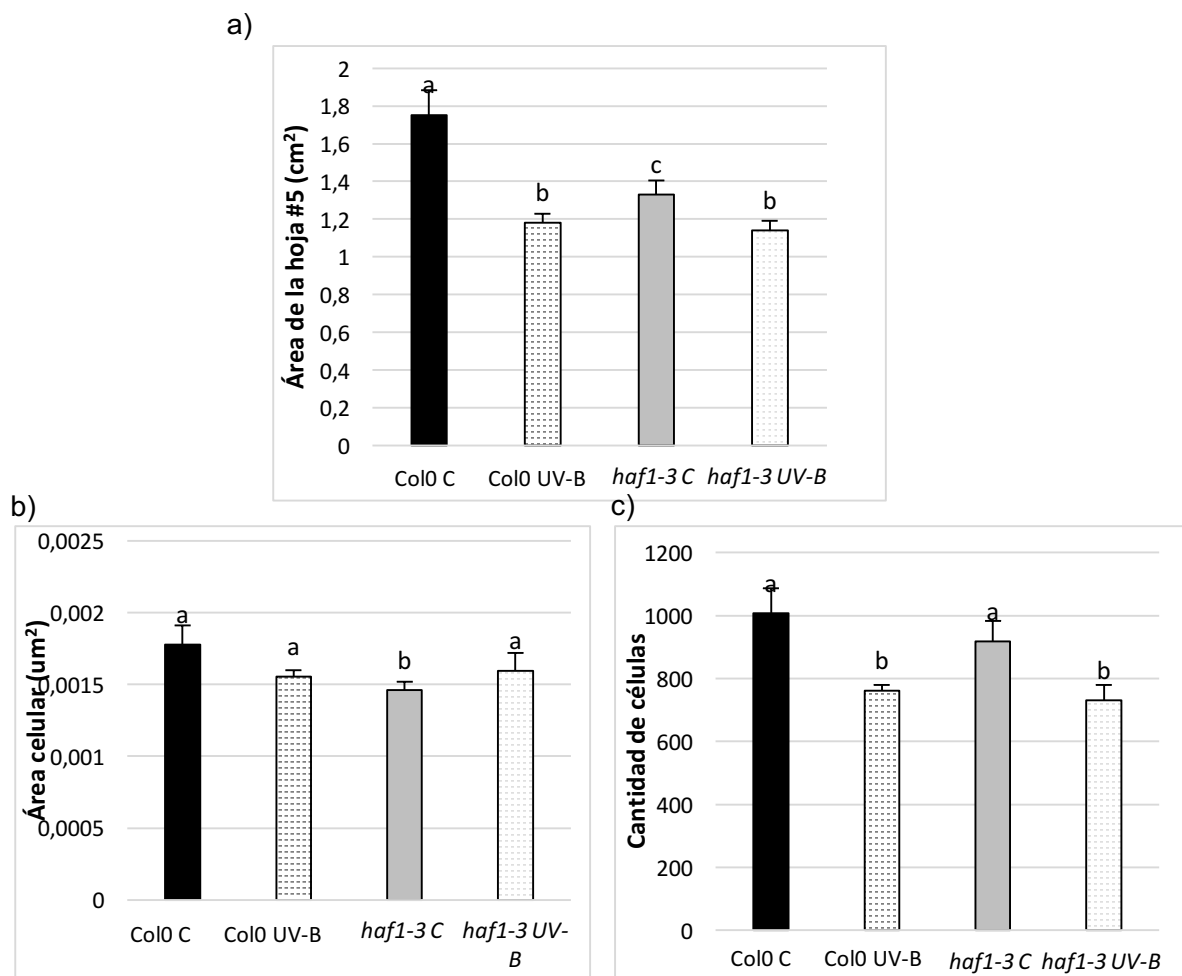


Figura 41. a) Área de la hoja #5 (mm²), b) número de células promedio y c) área celular (um²) de plantas *haf1-3* y salvajes tratadas con radiación UV-B durante 4 h o mantenidas en condiciones control en ausencia de UV-B (C). Cada barra corresponde al promedio de al menos 10 plantas y la barra de error corresponde al error estándar. Los experimentos fueron realizados por triplicado obteniéndose resultados similares. Las letras muestran diferencias significativas entre las líneas y condiciones (C y UV-B), al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

2.4.3.4.2.1 Determinación de los niveles de ploidía de la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *haf1-3* expuestas a la radiación UV-B

Para evaluar si el efecto de compensación observado en las plantas *haf1* se debía a un aumento en el nivel de ploidía, se determinaron, a través de la técnica de citometría de flujo, los niveles de ploidía en el ADN de la hoja #5 de plantas salvajes y mutantes *haf1*, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con radiación UV-B. Para ello, se usaron plantas de 4 semanas las cuales fueron irradiadas con UV-B (2 W.m⁻² durante 4 h, durante un único día) en el momento en el que la hoja #5 estaba emergiendo, y plantas controles que no fueron expuestas al UV-B. En la Figura 42 se muestran los histogramas obtenidos, donde el área de cada pico representa la cantidad de núcleos que tienen una ploidía determinada. El pico 2C se refiere a núcleos con genoma diploide. Por su parte, el pico 4C corresponde a núcleos que se replicaron pero no se dividieron y como consecuencia, tienen el doble del contenido de

ADN inicial; es decir que sufrieron una vez el proceso de endoreduplicación. Lo mismo sucede con los núcleos correspondientes al pico en 8C, los cuales tienen cuatro veces la cantidad de ADN inicial y los núcleos en 16C y 32C tienen 4 y 5 ciclos de endoreduplicación, respectivamente. A partir de la cuantificación del área de los picos obtenidos en los histogramas se calculó el porcentaje de núcleos para cada número de ploidía para la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *haf1-3*, expuestas o no a la radiación UV-B (Figura 43a). La cantidad de núcleos en cada clase de ploidía del ADN en las hojas de las plantas salvajes tratadas con UV-B fue similar al de las plantas control (C). Por otro lado, las hojas de plantas mutantes *haf1-3*

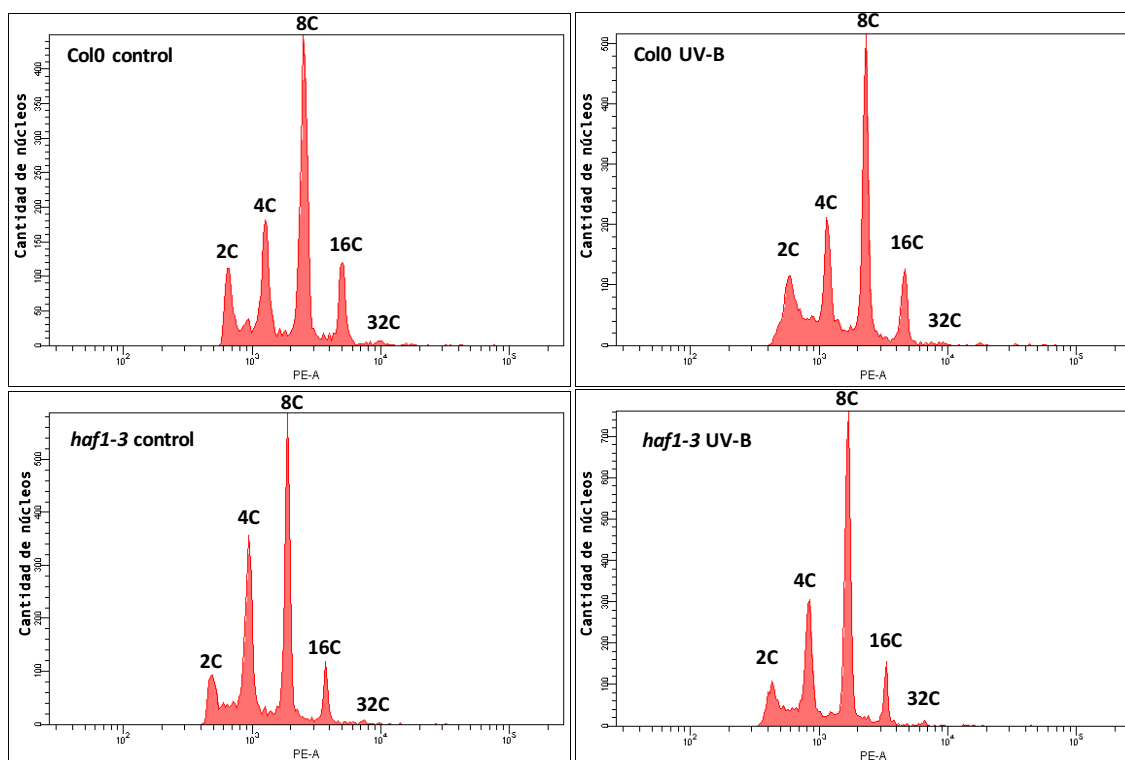


Figura 42: Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo de la hoja #5 de las plantas salvajes y mutantes *haf1-3*, tanto en condiciones control como luego de la exposición al UV-B. El área de cada pico representa la cantidad de núcleos en cada fase de ploidía.

en ausencia de UV-B (C) presentaron una menor cantidad de núcleos 8C, 16C y 32C que las plantas salvajes en la misma condición. Sin embargo, luego del tratamiento con UV-B, las hojas de plantas *haf1-3* presentaron mayor cantidad de núcleos en las fases de mayor ploidía, 8C, 16C y 32C que las hojas *haf1-3* crecidas en ausencia de UV-B. Esta observación se validó calculando el índice de endorreduplicación (IE), el mismo fue similar tanto para las hojas de plantas salvajes en condiciones control como para las expuestas al UV-B (Figura 43b). A diferencia de ello, las hojas de las plantas mutantes *haf1-3* presentaron un IE menor en condiciones control que las hojas de las plantas salvajes bajo las mismas condiciones; sin embargo, luego del tratamiento con

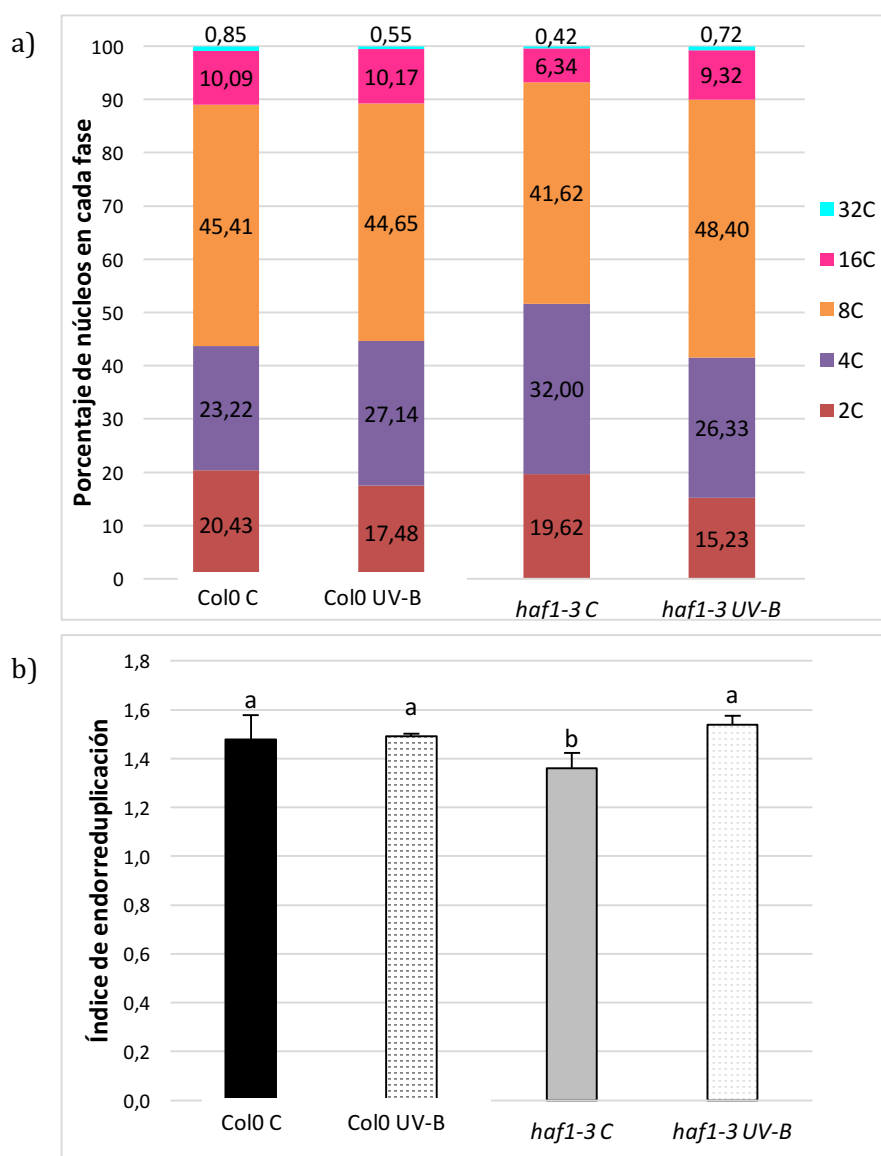


Figura 43: Niveles de ploidía de la hoja #5 de plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *haf1-3* expuestas a la radiación UV-B. A) Número de núcleos (% del total) para cada fase de ploidía (2C, 4C, 8C, 16C, 32C) en la hoja #4 de plantas de *Arabidopsis* Col0 y mutantes *haf1-3* en presencia o ausencia del tratamiento con UV-B. B) Índice de endorreduplicación de la hoja #5 de las plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *haf1-3* tratadas y sin tratar con UV-B y de hojas control. Los valores se obtuvieron utilizando los datos mostrados en la Figura a. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) aplicando el test ANOVA. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

UV-B, el IE de las hojas de las plantas mutantes aumentó significativamente en comparación al IE de hojas de estas plantas en condiciones control (Figura 43b). De esta manera, el área de las células de las hojas de las mutantes *haf1* se correlaciona con los niveles de ploidía del ADN de las mismas.

2.4.3.4.3 Análisis de la regulación de la expresión de genes que participan en la endoreduplicación

Los factores de transcripción E2F/DP son importantes reguladores de los ciclos celulares mitótico y de endoreduplicación, los mismos se encuentran altamente conservados en las plantas y en los animales (Mariconti y col., 2002). *Arabidopsis* posee 6 factores de transcripción E2F, que están divididos en dos grupos, los E2Fs típicos y los atípicos. Los primeros tres, E2Fa, E2Fb y E2Fc, poseen un dominio de unión al ADN y otro dominio de dimerización que le permite unirse a las proteínas DP (DPa y DPb), las cuales también poseen un dominio de unión al ADN. Estos factores forman heterodímeros para así unirse con gran afinidad a los promotores de los genes blanco, entre los que se encuentran los genes de reparación y replicación del ADN (Lammens y col., 2009). Por otra parte, los E2Fs atípicos, E2Fd, E2Fe y E2Ff o también conocidos como proteínas DEL, carecen de este tipo de dominio de dimerización, aunque tienen dos dominios de unión al ADN que les permiten unirse a las mismas secuencias *cis* que los E2Fs típicos (Lammens y col., 2009). Los factores de transcripción E2F son componentes claves de la vía ciclinaD/retinoblastoma (RB)/E2F, un punto de control crítico en el progreso del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S (Mariconti y col., 2002).

El factor E2F atípico E2Fe/DEL1 es un regulador negativo de la transición de la mitosis al endociclo (Radziejwoski y col., 2011). La expresión de *E2Fe/DEL1* está regulada por E2Fb y E2Fc, que actúan en forma antagónica y conforme a la presencia o ausencia de luz. De esta forma, E2Fb y E2Fc compiten por el mismo elemento *cis* en el promotor de *E2Fe/DEL1*, y por lo tanto los niveles de este transcripto dependen de la abundancia relativa entre estos factores de transcripción. E2Fb activa la expresión de *E2Fe/DEL1* y actúa en presencia de luz, mientras que en oscuridad predomina E2Fc que regula negativamente la expresión de *E2Fe/DEL1* (Berckmans y col., 2011)

Dado que las hojas de las plantas de *Arabidopsis* mutantes *haf1-3* en ausencia de UV-B presentaron un índice de endorreduplicación menor que aumentó luego del tratamiento, se analizaron los niveles de expresión de los genes *E2Fe/DEL1*, *E2Fb* y *E2Fc*, que intervienen en forma directa o indirecta regulando este proceso. Para ello, se midieron los niveles de los transcritos mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real a partir del ARN obtenido de la hoja #5. En la Figura 44, se puede observar que las plantas salvajes no presentan diferencias en los niveles del transcripto *E2Fb* en condiciones control y luego de la exposición al UV-B, mientras que los niveles de *E2Fe* disminuyen y los niveles de *E2Fc* aumentan luego del tratamiento con UV-B. Por otro lado, las plantas *haf1-3* presentaron mayores niveles de los transcritos *E2Fb* y *E2Fe* en condiciones control que las plantas salvajes, los cuales disminuyen luego del tratamiento con UV-B alcanzando similares niveles a los determinados en las plantas salvajes. Por el contrario, los niveles de *E2Fc* fueron mayores en las plantas mutantes en condiciones control que en las plantas salvajes y aumentaron luego del tratamiento con UV-B en ambas plantas, siendo aún mayores los niveles alcanzados en las plantas mutantes. De esta manera, la expresión de *E2Fb*, *E2Fc* y *E2Fe* en las hojas de las plantas mutantes *haf1-3* se correlaciona con los IE determinados, dado que altos niveles de *E2Fb* y en consecuencia altos niveles de *E2Fe* favorecen la mitosis, mientras que bajos niveles de los mismos favorecen el endociclo. En las hojas de las plantas salvajes, si bien se observan cambios significativos por la radiación UV-B en la

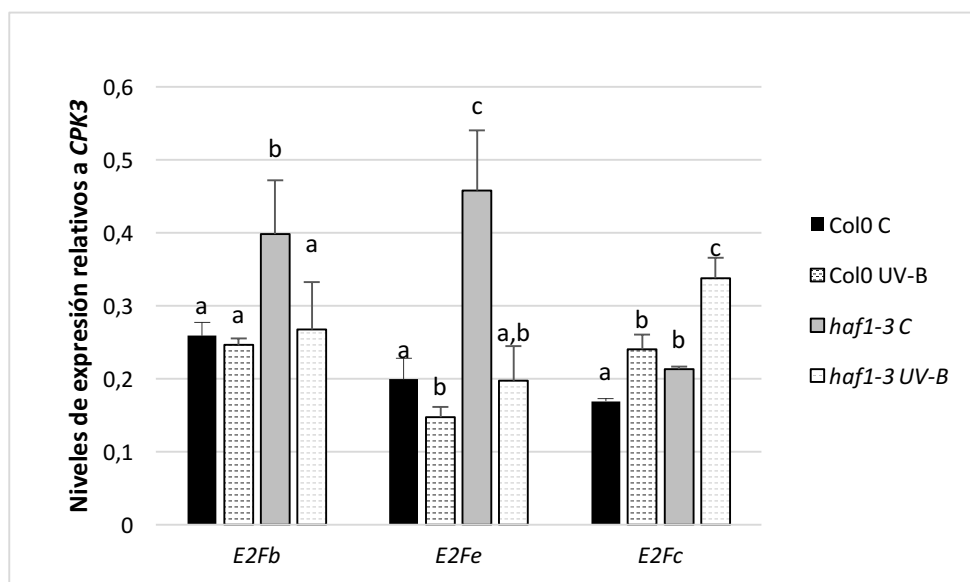


Figura 44. Expresión de los genes *E2Fb*, *E2Fe* y *E2Fc* en hojas de plantas salvajes y *haf1-3*, en condiciones control y luego de la exposición con UV-B. Las diferencias significativas para cada planta se denotan con letras, siendo los niveles de expresión de cada transcripto analizados individualmente. Los mismos se analizaron aplicando ANOVA con un $p < 0,05$.

expresión de *E2Fe* y *E2Fc*, los mismos son de 1,35 y 1,41 veces con respecto a los medidos en las plantas control, siendo estos cambios significativamente menores a los determinados en las plantas mutantes *haf1-3* (2,29 y 2,31, respectivamente).

2.4.3.5 Estudio del daño oxidativo producido por la radiación UV-B en las plantas de *Arabidopsis* mutantes *haf1-3*

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) comprenden distintas especies radicales, los radicales superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), perhidroxilo (HO_2^-) y alcóxido (RO^-); y no radicales, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2). En los cloroplastos, los fotosistemas I y II son los principales sitios de producción de 1O_2 y O_2^- ; y en las mitocondrias, los complejos de la cadena de transporte de electrones son los mayores productores de O_2^- . Las EROs son especies altamente reactivas y tóxicas que causan daño a las proteínas, los lípidos, los carbohidratos, el ADN, y en última instancia producen muerte celular (Gill y Tuteja, 2010). El equilibrio entre la producción y eliminación de las EROs puede estar alterada por estrés del tipo biótico y abiótico, entre los que se encuentra la radiación UV-B (Gill y Tuteja, 2010). Por ello, se analizaron distintos parámetros para evaluar el estado oxidativo de las plantas mutantes *haf1-3* luego de la exposición al UV-B.

La radiación UV-B puede provocar un aumento en la permeabilidad de las membranas debido al daño oxidativo en los lípidos causado por las EROs formadas resultando en una mayor liberación de iones y electrolitos al medio (Murphy, 1983). Así, la medida de la pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza para estimar la integridad de las membranas. Por ello, se determinó la liberación de electrolitos en las plántulas salvajes y en plántulas mutantes *haf1-3* en condiciones control en ausencia de UV-B y luego de un tratamiento de 4 h a $2W.m^{-2}$ con esta radiación. En las plántulas salvajes, la liberación de electrolitos aumentó significativamente luego de la exposición con UV-B; por el contrario, en las mutantes *haf1-3* los niveles de electrolitos liberados en condiciones control fueron significativamente mayores que en las plántulas salvajes (Figura 45). Luego del tratamiento, los electrolitos liberados en las mutantes *haf1-3* no cambiaron, mostrando valores similares a los determinados en las plantas salvajes en las mismas condiciones.

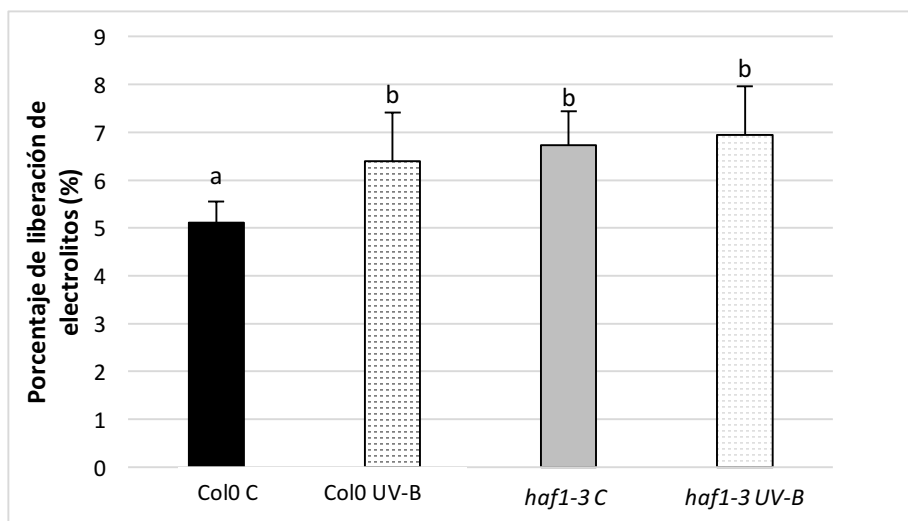


Figura 45: Medida de la liberación de electrolitos en las plantas de *Arabidopsis* Col0 y *haf1-3* luego del tratamiento con UV-B. Los niveles de liberación de electrolitos se midieron en plantas tratadas con UV-B durante 4 h, o mantenidas en condiciones control; y después de autoclavar el medio. Las diferentes letras denotan diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados son los componentes principales de las membranas biológicas y son altamente susceptibles a la peroxidación por las EROs, tales como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Blokhina y col., 2003). En el estadio final del proceso oxidativo se producen aldehídos altamente tóxicos para la célula, como el malonilaldehído, los cuales pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico formando derivados llamados TBARS (o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), que son indicativos del daño en las membranas provocados por la lipoperoxidación. Por consiguiente, para evaluar el daño ocasionado a los lípidos de las membranas por las EROs se cuantificó el contenido de TBARS, tanto en las plantas salvajes como en las plantas mutantes *haf1-3* crecidas en ausencia de luz UV-B durante 15 días y posteriormente expuestas a radiación UV-B (2 W.m^{-2} durante 4 h), o mantenidas en condiciones control en ausencia de UV-B. Finalizado el tratamiento, se recolectaron muestras de hojas y se realizaron los extractos correspondientes según como se indica en la sección 2.3.17.2 de Materiales y Métodos del presente trabajo.

En la Figura 46 se observa que las plantas salvajes mostraron una mayor peroxidación lipídica luego del tratamiento con UV-B; mientras que las plantas mutantes *haf1-3*, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B, presentaron niveles de peroxidación lipídica altos y similares a los niveles determinados en las plantas salvajes irradiadas con UV-B.

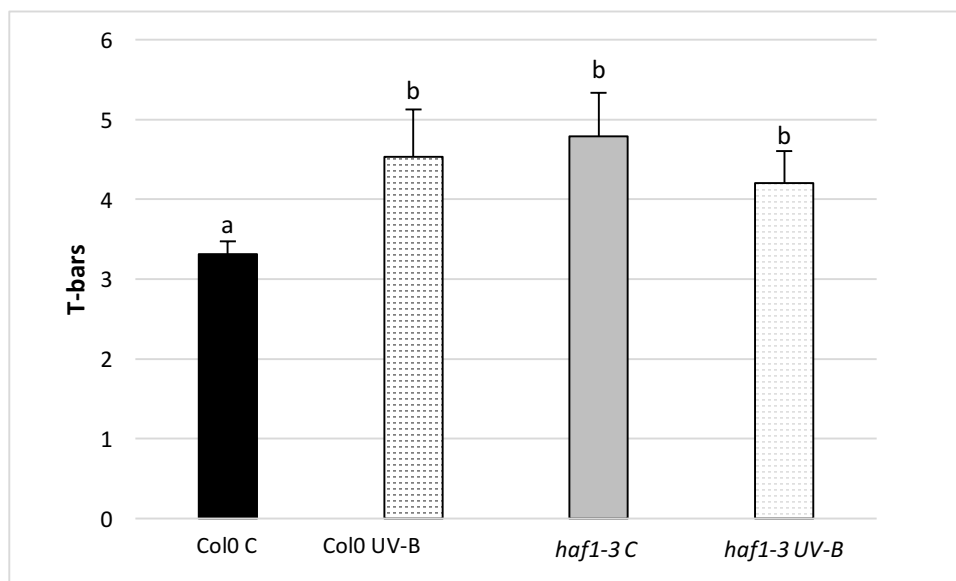


Figura 46. Niveles de TBARS en plantas salvajes y mutantes *haf1-3* tratadas con UV-B. Para cada línea las determinaciones se realizaron al menos 3 veces. Las diferentes letras indican variaciones significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

Por otro lado, el anión superóxido O_2^- es una de las especies de EROs más importantes debido a que, a través de una serie de reacciones, puede transformarse en H_2O_2 , OH^- y otras formas de EROs, que como se mencionó anteriormente, son altamente reactivas y tóxicas para la célula (Gill y Tuteja, 2010). A continuación, se analizaron los niveles del anión superóxido, como se detalla en la sección 2.3.17.3 de Materiales y Métodos, en las plantas de *Arabidopsis* mutantes *haf1-3* y en las plantas salvajes mantenidas en condiciones control y expuestas a la radiación UV-B. En ausencia de UV-B, las plantas salvajes no mostraron tinción con NBT, indicando que los niveles de O_2^- son bajos en estas condiciones (Figura 47). Luego de la exposición con UV-B, las plantas salvajes mostraron coloración azul, indicando que los niveles de EROs aumentan luego del tratamiento con UV-B. Por otro lado, las plantas mutantes *haf1-3* presentaron una coloración azul, tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B, sugiriendo que estas plantas presentan un estrés oxidativo basal en ausencia de UV-B. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en los experimentos de liberación de electrolitos y la medida de los niveles de TBARS, demostrando que las plantas *haf1-3* muestran un nivel basal de estrés oxidativo que es similar al que alcanzan las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B.

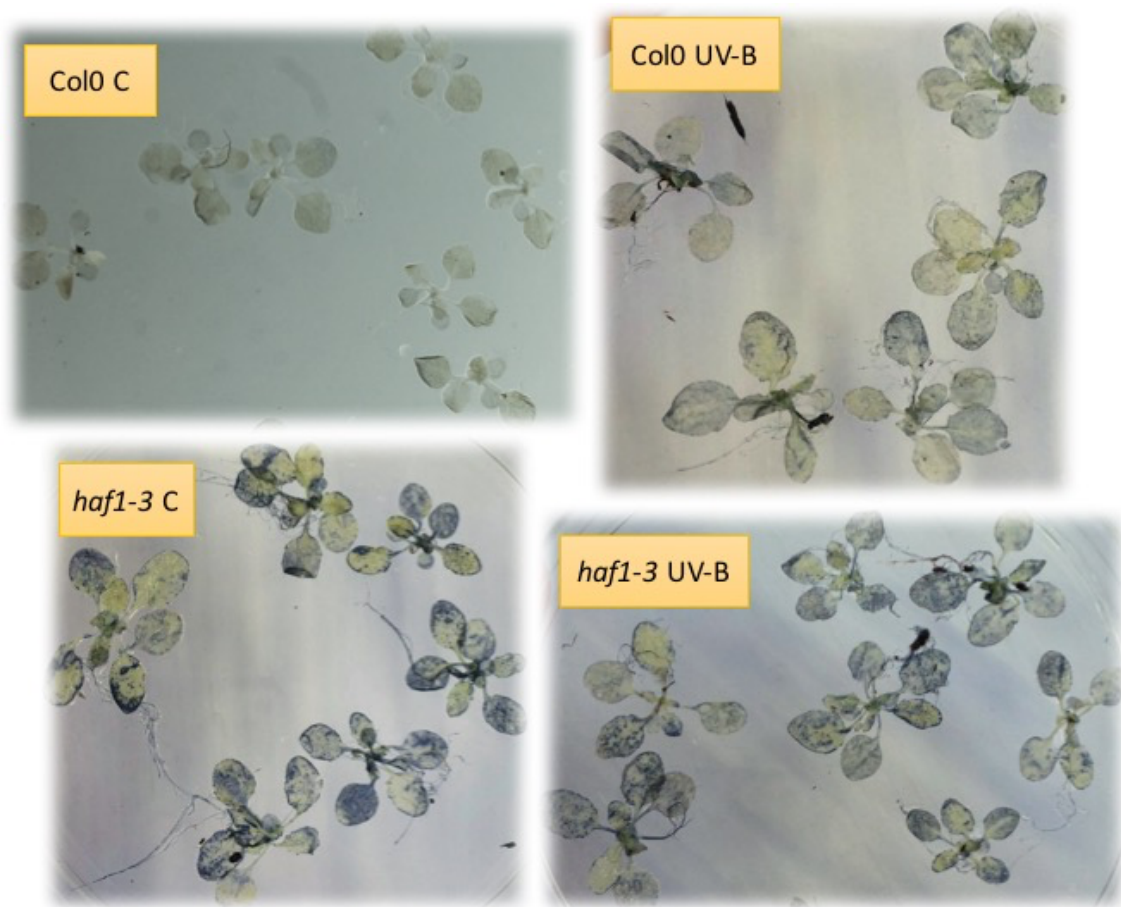


Figura 47: Fotos de plantas de 15 días salvajes y *haf1-3* tratadas (UV-B) y no tratadas con UV-B (C) y teñidas con una solución de NBT.

2.4.3.6 Conclusiones y discusión

En esta parte del capítulo analizamos el posible rol de las histonas acetiltransferasas de la familia TAFII250 (HAF1 y HAF2) en distintas respuestas a la radiación UV-B en *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones ensayadas, ninguna de las histonas acetiltransferasas de la familia TAFII250 participa en la reparación del daño en el ADN producido por la exposición a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis*. Previamente, Waterworth y col. (2015) demostraron que las plantas mutantes *haf1-3* son sensibles a los rayos X y a mitomicina C, pero no a otras formas de estrés abiótico como estrés salino y osmótico, sugiriendo que HAF1 participa en algunos procesos de reparación del ADN. Mientras que la radiación UV-B induce la formación de enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes que son reparados por fotoliasas específicas (Jansen y col., 1998; Rastogi y col., 2010; Parihar y col., 2015), la mitomicina C provoca entrecruzamientos en el ADN que son generalmente reparados por recombinación homóloga (Reiss y col., 1996). Por otro lado, los rayos X provocan diferentes lesiones en el ADN como por ejemplo cortes en la doble hebra que son generalmente reparados por los mecanismos de reparación por escisión (Manova y Gruszka, 2015). Tanto los sistemas de reparación por escisión como la recombinación homóloga están compuestos de varias proteínas, por lo que es posible que estén más influenciados por la organización de la cromatina y la acetilación de las histonas que la fotoreparación, la cual sólo necesita de las fotoliasas.

A pesar de que las histonas acetiltransferasas de la familia HAF no estarían involucradas en la reparación del daño en el ADN causado por la radiación UV-B, en este trabajo se presentan evidencias de que HAF1 posee un rol en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y de las hojas provocada por la radiación UV-B, dado que las plantas mutantes mostraron una menor inhibición del crecimiento por UV-B de ambos órganos vegetales. Por otro lado, se demostró que la hoja #5 de las plantas mutantes *haf1* en condiciones control en ausencia de UV-B es menor que la misma hoja de plantas salvajes, y esto se debe a que la hoja #5 de las plantas mutantes posee células de menor tamaño. Consistentemente con estos resultados, las hojas de las plantas *haf1* presentaron menores índices de endorreduplicación que las plantas salvajes, sugiriendo que el menor tamaño de las células de las hojas *haf1* podría estar determinado por el contenido de ADN (Massonnet y col., 2011). Por otro lado, el área de la hoja #5 de las plantas *haf1* expuestas a la radiación UV-B fue similar al de hojas de plantas salvajes, con un área celular y una cantidad de células similares. El aumento del área celular de las hojas de las plantas *haf1* expuestas al UV-B se correlacionó con un aumento en el índice de endorreduplicación. Por lo tanto, estos

resultados indican que la ausencia de *HAF1* en condiciones control disminuyen la endorreduplicación y consecuentemente el área celular, pero luego de la exposición al UV-B, la ploidía y el área celular aumentan, posiblemente como un mecanismo de compensación; es decir, la hoja #5 de las plantas *haf1*, las cuales son más chicas en condiciones control y tienen alterada la proliferación celular bajo condiciones de UV-B, pueden alcanzar el tamaño final y no disminuyen aún más su tamaño. En condiciones ambientales adversas, se ha propuesto que las plantas que endorreduplican su ADN crecen más rápido que las plantas sin endopoliploidía porque combinan las ventajas de especies con genoma pequeño y las ventajas de especies con genoma grande. Un genoma pequeño permite que las células se dupliquen rápidamente a un costo bajo de energía, mientras que un genoma grande permite el mantenimiento de células grandes. Estas características pueden ser importantes en condiciones que limitan la división celular (Barow y Meister, 2003). Otra hipótesis es que el aumento en el número de copias de los genes podría evitar la pérdida de genes esenciales, como por ejemplo, la pérdida de genes por daños en el ADN (Hase y col., 2006). Consistente con esta hipótesis, en algunos casos se ha demostrado que la endorreduplicación aumenta en plantas que están expuestas constantemente a la radiación UV-B (Hase y col., 2006; Gegas y col., 2014).

El factor de transcripción E2Fe/DEL1 es un importante regulador del endociclo. Este factor reprime la endorreduplicación a través de la represión transcripcional de un activador del complejo promotor de la anafase (APC), una ubiquitina ligasa (Berckmans y col., 2011). De esta manera, en presencia de E2Fe/DEL1 se acumulan las ciclinas que conducen a la mitosis; mientras que en su ausencia el endociclo está favorecido (Berckmans y col., 2011). También se ha demostrado que E2Fe/DEL1 es un represor de *PHR1/UVR2*, la fotoliasa que repara dímeros de ciclobutano en el ADN; y que los niveles de este factor de transcripción disminuyen luego de la exposición al UV-B (Radziejwoski y col., 2011). De este modo, una disminución de E2Fe/DEL1 se corresponde con una mayor tolerancia de las plantas a la radiación UV-B, no sólo por el rol de la fotoliasa sino también por un aumento de células que entran en endociclo (Radziejwoski y col., 2011). Por otro lado, como fue mencionado anteriormente, la expresión de *E2Fe/DEL1* está regulada por E2Fb y E2Fc, que actúan en forma antagónica; E2Fb activa la expresión de *E2Fe* mientras que E2Fc la reprime (Berckmans y col., 2011). En la hoja #5 de las plantas *haf1*, la expresión de *E2Fe* en condiciones control en ausencia de UV-B es significativamente mayor que en las hojas de las plantas salvajes, mientras que luego del tratamiento con UV-B su expresión disminuye alrededor de 2,3 veces en dichas plantas, mostrando niveles similares a los de las plantas salvajes. Observamos además que los niveles de expresión de *E2Fe* se

correlacionan directamente con los niveles de *E2Fb* e inversamente con los niveles de *E2Fc*, en concordancia con lo que previamente fue publicado (Berckmans y col., 2011). Las diferencias en la expresión de los factores de transcripción E2F podría ser una de las causas de las diferencias en los niveles de ploidía medidos en las plantas *haf1*. Consistente con nuestros resultados, Vlieghe y col. (2005) demostraron que las hojas de plantas que sobreexpresan el factor de transcripción *E2Fe* poseen hojas de menor tamaño que las plantas salvajes como resultados de un menor área celular y menores niveles de endorreducción. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que HAF1, directa o indirectamente, regularía los niveles de expresión de *E2Fb*, *E2Fc* y *E2Fe*, posiblemente acetilando las histonas asociadas a estos genes o alternativamente a distintos reguladores de estos genes.

Por último, resulta interesante mencionar que las plantas *haf1* presentaron elevados niveles de EROs tanto en condiciones control como luego del tratamiento con UV-B, y podría ser ésta una de las razones por las que las plantas mutantes *haf1* son menos sensibles al UV-B, debido a que se ha propuesto en varios estudios recientes que algunas EROs cumplen un rol como molécula de señalización en procesos de aclimatación frente a distintos tipos de estrés, como la sequía, altas y bajas temperaturas, metales pesados, entre otros (Revisados en Hossain y col., 2015).

3 “Estudio del crecimiento de la hoja de plantas de maíz expuestas al UV-B solar”

3.1 Introducción

En Argentina, la producción agropecuaria es uno de los ejes de la economía, siendo el maíz uno de los principales cultivos. La demanda mundial del maíz crece año tras año; por lo tanto, para responder a esta demanda y abastecer las necesidades de una población en aumento, la productividad del maíz deberá incrementarse en forma significativa. Argentina es uno de los países productores de granos y aceite más importantes en el mundo, jugando un papel relevante en el abastecimiento del mercado mundial. El crecimiento de la superficie sembrada y cosechada, los rendimientos unitarios y la producción de granos en Argentina ha aumentado significativamente en esta década. Con poco más de 30 millones de hectáreas ocupadas, la producción conjunta de granos y semillas oleaginosas actualmente supera el umbral de 90 millones de toneladas (Bolsa de comercio de Rosario, Estimaciones de Producción, 2015). Las exportaciones de granos totales de Argentina en 2016 se previó que sea alrededor de 29,6 millones de toneladas, lo que sería superior a 26,3 millones exportados en 2014-2015 (Lyddon, 2015; Joseph, 2015). Para eso deberán adoptarse variedades con mejores características que permitan optimizar la producción sin la necesidad de aumentar el área sembrada (Consejo Internacional de Cereales (IGC), 2015).

La producción de los cultivos depende de la absorción de la radiación solar y de la utilización de la misma para su conversión en biomasa. La cantidad de radiación incidente está determinada por el área foliar que posea una planta, por la orientación de las hojas y por la duración e intensidad lumínica de la exposición (Campillo y col., 2012).

3.1.1 Desarrollo de las hojas

El crecimiento de las plantas se ve afectado por las condiciones ambientales. La velocidad de crecimiento en condiciones óptimas o limitantes puede determinar el rendimiento de un cultivo (Rymen y col., 2010). Para alcanzar el tamaño y forma final de las hojas, el desarrollo tiene que estar altamente coordinado a nivel celular, desde la proliferación hasta la expansión y la maduración celular (Piazza y col., 2005; Tsukaya, 2006). En *Arabidopsis thaliana*, las etapas de proliferación y expansión celular están separadas temporalmente. En estadios tempranos del desarrollo de una hoja se observan células en proliferación a lo largo de todo el limbo de la misma (Donnelly y col., 1999; Gonzalez y col., 2012). A continuación, el ciclo celular se detiene en el ápice y un frente de arresto mitótico se propaga hacia la base del órgano (Donnelly y col., 1999; Gonzalez y col., 2012). Una vez que las células cesan de dividirse comienza el proceso de expansión celular, durante el cual las células crecen

varios miles de veces hasta que las hojas logran su tamaño final (Piazza y col., 2005; Tsukaya, 2006). A diferencia de *Arabidopsis*, en las plantas monocotiledóneas como maíz, la proliferación y la expansión celular están separadas temporal y espacialmente. Por ello, el maíz es un buen modelo para la investigación de los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento, debido a la organización de la división celular y expansión a lo largo de su eje longitudinal (Granier y Tardieu, 2009; Nelissen y col., 2012). En esta especie, se pueden diferenciar cuatro fases durante el desarrollo de la hoja (Figura 48) (Granier y Tardieu, 2009). En la primera fase, el largo de la hoja aumenta exponencialmente con el tiempo, y el largo celular es aproximadamente constante desde la base hasta la punta de la hoja. La hoja es considerada como un único compartimento denominado DEZ (del inglés “Dividing and Elongating Zone”) con células que se están dividiendo y expandiendo coordinadamente. Durante la segunda fase, se desarrolla una nueva zona denominada EZ (del inglés “Elongation Zone”), la cual está compuesta sólo por células en elongación. Por lo tanto, la hoja en este estadio se encuentra formada por la zona de crecimiento (GZ, del inglés “Growing Zone”) que incluye tanto la DEZ como la EZ. Estas dos etapas ocurren antes de la emergencia de la hoja. Durante la tercera fase de crecimiento, la zona de crecimiento adquiere un tamaño determinado y las células que ya dejaron de expandirse dejan esta zona creando la zona madura (MZ, del inglés “Mature Zone”), que aumenta su tamaño en función del tiempo. Finalmente, la longitud de la GZ se reduce hasta que toda la hoja se compone sólo de células maduras. Este evento marca el final de la cuarta fase (Granier y Tardieu, 2009). Como puede observarse en la Figura 48, durante la tercera fase del crecimiento (también llamada fase de crecimiento en estado estacionario), se encuentran células en división, en

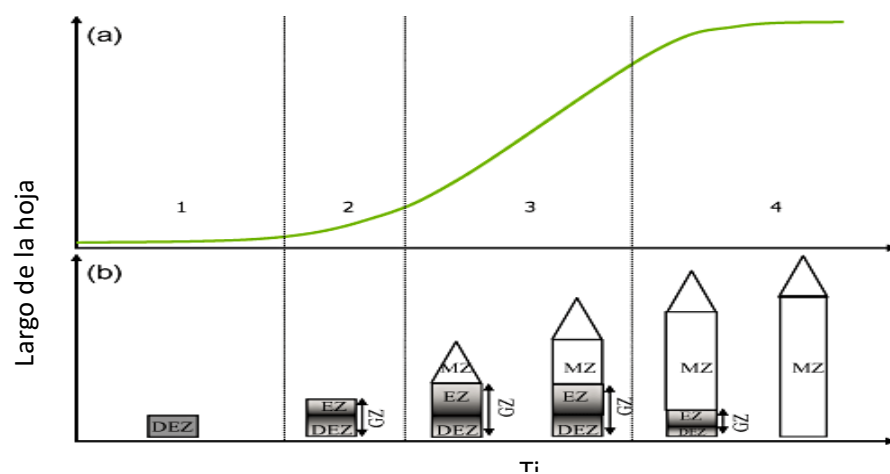


Figura 48: Representación esquemática de las fases del desarrollo de la hoja de la planta de maíz. Los números indican las diferentes fases del desarrollo de la hoja y las líneas verticales indican la transición de una fase a la siguiente. Adaptado de Granier and Tardieu (2009).

elongación y células maduras a medida que aumenta la distancia desde la base de la hoja. Durante esta fase, la velocidad de crecimiento es constante y la zona de crecimiento tiene una longitud definida; por lo tanto este estadio puede utilizarse para realizar un análisis cinemático de crecimiento.

3.1.1.1 Transición de la etapa de división a la etapa de expansión celular

La cantidad de células que se generan durante la etapa de proliferación celular determinan, en última instancia, el tamaño final de las hojas (Andriankaja y col., 2012; Gonzalez y col., 2012; Kalve, De Vos, y col., 2014). En *Arabidopsis thaliana*, los factores involucrados en la transición de la etapa de proliferación celular a la de expansión celular han sido ampliamente estudiados. Dentro de los factores que regulan esta transición, las fitohormonas y los factores de transcripción GRFs (del inglés “Growth regulating factors”) podrían jugar un papel importante (Mizukami y Fischer, 2000; Hu y col., 2003; Kim y col., 2003; Werner y col., 2003; Liu y col., 2009; Rodriguez y col., 2010; Nelissen y col., 2012; Kalve, De Vos, y col., 2014).

3.1.1.1.1 Fitohormonas

Las hormonas vegetales controlan el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través de la regulación de la expresión génica. Las hormonas juegan un papel crucial en la regulación de actividades celulares como la división y la diferenciación celular, la elongación, la organogénesis, la reproducción y las respuestas frente a distintos tipos de estreses bióticos y abióticos (El-yazal y col., 2015). Las cinco hormonas clásicas que se descubrieron a mitad del siglo XX son las citoquininas, las auxinas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno; mientras que más recientemente se han caracterizado otras fitohormonas como el ácido salicílico, los brasinoesteroides y el ácido jasmónico.

Las distintas hormonas son moléculas estructuralmente diversas, que actúan generalmente en pequeñas concentraciones. En las últimas décadas, las investigaciones se han centrado en identificar a los receptores de las distintas hormonas y a las vías de transducción que ellas activan; sin embargo, cada una de estas vías de señalización están interconectadas en una red compleja, y la interacción entre las diferentes vías es esencial para coordinar el crecimiento de las plantas en respuesta a los cambios ambientales (El-yazal y col., 2015). A continuación se exponen algunos detalles de las vías hormonales individuales:

3.1.1.1.1.1 Citoquininas

Las citoquininas son moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral isoprenoide o aromática. Entre las citoquininas isoprenoides se encuentran la (cis- y trans-) zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina, con sus respectivos derivados

glicosilados; y entre las aromáticas se incluyen la benciladenina, la kinetina y la topolina, las cuales se encuentran en menores concentraciones que las citoquininas isoprenoides en las plantas (Ha y col., 2012). El paso limitante de la biosíntesis de las citoquininas está catalizado por las isopenteniltransferasas (IPTs), las cuales utilizan ADP, ATP y tRNA para llevar a cabo su reacción. Las formas biológicamente más activas de las citoquininas del tipo trans-zeatina e isopenteniladenina se producen predominantemente en el cloroplasto, mientras que la cadena isoprenoide de las citoquininas del tipo cis-zeatina es sintetizada en el citoplasma. Este tipo de citoquininas son más abundantes en plantas monocotiledóneas (Ha y col., 2012), por ejemplo en plantas de maíz se midieron niveles altos de cis-zeatina en órganos vegetativos, mientras que no se detectó trans-zeatina (Šmehilová y col., 2009).

Varios estudios sugieren que la degradación de las citoquininas tiene un rol importante en el desarrollo y en la adaptación de las plantas a diferentes condiciones ambientales (Werner y col., 2003; Carabelli y col., 2007; Nishiyama y col., 2011; Gonzalez y col., 2012). Este proceso es llevado a cabo por las citoquininas oxidasas, las cuales degradan irreversiblemente las citoquininas. Se ha predicho que existen 7 citoquininas oxidasas en *Arabidopsis thaliana* y 13 en maíz (Franc y col., 2012). Las proteínas predichas de maíz tienen tamaños similares (≈ 60 KDa) y distintos péptidos de tránsito en el extremo N-terminal, indicando que poseen diferentes localizaciones subcelulares (Werner y col., 2003). La sobreexpresión de diferentes citoquinas oxidasas de *Arabidopsis* causan una disminución en los niveles de citoquininas, y consecuentemente una reducción en el área de la hoja, causada fundamentalmente por una disminución de la división celular (Werner y col., 2003).

3.1.1.1.1.2 Auxinas

La hormona auxina o ácido indolacético (IAA) posee un rol importante durante todo el desarrollo de las plantas, dado que participa en la división, la elongación y la diferenciación celular, y consecuentemente influye sobre la forma final y la función de las células y tejidos en todas las plantas superiores. El metabolismo de esta hormona no se conoce completamente, pero recientemente se han descubierto algunos procesos que regulan su síntesis y degradación (Revisados en Ljung, 2013).

Entre los factores que podrían regular la transición entre la proliferación y la expansión celular, la hormona auxina juega un papel importante, debido a que induce la expresión de *ARGOS* (del inglés: “*AUXIN- REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE*”, Hu y col., 2003). Plantas sobreexpresantes o mutantes en *ARGOS* mostraron tener mayor o menor tamaño de las hojas, debido a que poseen mayor o menor cantidad de células, respectivamente (Hu y col., 2003). *ARGOS* regula la función de la proteína de unión a ADN, ANT (del inglés “*AINTEGUMENTA*”) y de la

ciclina CYCD3;1, las cuales son reguladores claves de la proliferación celular. Además, plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de *ANT* poseen hojas de mayor tamaño, mientras que plantas mutantes en este gen producen hojas más chicas (Mizukami y Fischer, 2000).

3.1.1.1.1.3 Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de ácidos carboxílicos tetracíclicos diterpenoides que actúan a lo largo de toda la vida de la planta estimulando el crecimiento de la mayoría de los órganos a través de la división y la elongación celular. También están involucradas en la transición entre distintas etapas del desarrollo, incluyendo la transición entre la dormancia de la semilla y la germinación, la transición entre las fases juvenil y adulta, y entre las fases vegetativa y reproductiva (Colebrook y col., 2014). La vía de señalización de las giberelinas involucra la biosíntesis de hormonas activas, su percepción, la transducción de la señal y su inactivación; y cada una de las etapas está regulada por factores ambientales, incluyendo el estrés abiótico (Colebrook y col., 2014).

Las giberelinas son sintetizadas a partir del geranilgeranil difosfato, y para la biosíntesis de giberelinas activas se requiere de la actividad de tres enzimas en las plantas: una terpeno sintasa, una citocromo P450 monooxigenasa y una dioxigenasa dependientes de 2-oxoglutarato. Las dioxigenasas encargadas de sintetizar las giberelinas bioactivas son las GA-20-oxidasa y la GA-3-oxidasa (Yamaguchi, 2008; Nelissen y col., 2012). Existen varias formas de giberelinas pero sólo algunas de ellas son bioactivas, las demás actuarían como precursoras de las formas activas (Yamaguchi, 2008; Colebrook y col., 2014). La inactivación de la giberelinas es importante para la regulación efectiva de la concentración de hormonas bioactivas en las plantas. Las giberelinas son inactivadas metabólicamente de diferentes formas; sin embargo la vía mejor caracterizada es llevada a cabo por las giberelinas-2-oxidadas, las cuales catalizan una reacción de hidroxilación (Yamaguchi, 2008).

Junto con las auxinas, las giberelinas también podrían estar involucradas en la transición de la etapa de división a la de expansión celular. Por ejemplo, en plantas de maíz, Nelissen y col. (2012) demostraron que los niveles de giberelinas presentan un máximo en la zona de transición entre las zonas de expansión y división celular, y que plantas mutantes y sobreexpresantes de giberelinas presentan alteraciones en el tamaño de la zona de división celular.

3.1.1.1.1.4 Ácido abscísico

El ácido abscísico o ABA es una hormona isoprenoide que regula varios procesos fisiológicos requeridos para el crecimiento y el desarrollo de las plantas,

como la germinación, la senescencia y la apertura de estomas. El ABA también regula las respuestas adaptativas frente a diferentes condiciones de estrés como la sequía, la salinidad y el estrés por frío (Ng y col., 2014; Sah y col., 2016). En condiciones de sequía, temperaturas extremas y alta salinidad, los niveles de ABA aumentan considerablemente para ayudar a las plantas a adaptarse y sobrevivir ante estas condiciones (Ng y col., 2014). Generalmente se ha considerado al ABA como un regulador negativo del crecimiento de las plantas, dado que promueve la dormancia del meristema durante el crecimiento vegetativo en las yemas axilares y las raíces (Shimizu-Sato y Mori, 2001; Zhang y col., 2010).

La biosíntesis del ABA ocurre en dos compartimentos diferentes; comienza en los plástidos y termina en el citosol. Los primeros pasos involucran la conversión de zeaxantina y anteraxantina en xantoxina en los plastidios, y luego, la xantoxina es exportada al citosol y convertida en ABA en dos reacciones enzimáticas (Sah y col., 2016). La concentración endógena de ABA se determina por el balance entre la biosíntesis del ABA y su catabolismo, así como también por la velocidad de transporte del ABA a sus sitios de acción. El catabolismo es llevado a cabo por dos vías diferentes denominadas hidroxilación y conjugación (Sah y col., 2016). La translocación de ABA entre las células, tejidos y órganos juega un papel importante en las respuestas de la planta frente a condiciones de estrés. El ABA es un ácido débil que puede difundir pasivamente a través de las membranas biológicas cuando se encuentra protonado; sin embargo, también puede ser transportado a través de las membranas por transportadores, los cuales fueron descubiertos por primera vez en plantas de *Arabidopsis* (Ng y col., 2014; Sah y col., 2016).

3.1.1.1.1.5 Etileno

La hormona etileno es un mensajero gaseoso que regula varios aspectos del ciclo de vida de las plantas, como por ejemplo la germinación, el desarrollo de la raíz y de los pelos radiculares, la floración, la maduración de los frutos, la senescencia y la respuesta a estrés bióticos (como el ataque de patógenos) y abióticos (como estrés por frío) (Lin y col., 2009). A nivel celular, el etileno inhibe la expansión celular (Vanstraelen y Benková, 2012), pero también puede regular la división celular (Street y col., 2015).

Análisis genéticos llevados a cabo durante las últimas décadas, principalmente utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ha dado como resultado la identificación de elementos claves que intervienen en la respuesta primaria al etileno (Revisados en Chen y col., 2005). La caracterización de estos elementos de señalización ha permitido postular un modelo para la transducción de señales de etileno, que es esencialmente una vía lineal, iniciada por la unión del etileno a los

receptores de membrana, y que culmina en la regulación transcripcional de genes que responden al etileno en el núcleo. Curiosamente, los receptores de etileno, así como los elementos de señalización iniciales en la vía, se localizan predominantemente en el retículo endoplasmático (ER). Todo el proceso de transducción de señales se activa por la unión del etileno a los receptores, y tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas, los receptores de etileno existen como familias multigénicas (Shakeel y col., 2013).

En *Arabidopsis*, los receptores de etileno están compuestos por una familia de 5 miembros, los cuales actúan como reguladores negativos dado que en ausencia de etileno, los receptores activan a CTR1 (del inglés “CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1”), una quinasa que suprime la respuesta al etileno, manteniendo fosforilada a EIN2 (del inglés “ETHYLENE INSENSITIVE 2”) (Street y col., 2015). En presencia de etileno, CTR1 es desactivada, y como consecuencia EIN2 se procesa proteolíticamente de manera que su dominio C-terminal se libera y migra al núcleo. En el núcleo, EIN2 inicia una regulación transcripcional que involucra a EIN3 (del inglés “ETHYLENE INSENSITIVE 3” Light y col., 2016). Dentro de los transcriptos regulados por el etileno se encuentra el transcripto *HYPOCOTYL SHORT 2*, el cual es un represor de la señalización de la auxina y es un punto de convergencia del etileno y las citoquininas en la regulación negativa de la proliferación celular (Street y col., 2015).

3.1.1.1.1.6 Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico que, a pesar de su amplia distribución en las plantas, tiene niveles basales diferentes entre las distintas especies (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). El ácido salicílico se sintetiza a través de dos vías diferentes que ocurren en distintos compartimentos; la ruta fenilpropanoide en el citoplasma se inicia a partir de la fenilalanina, y la vía del isocorismato tiene lugar en el cloroplasto. La mayor parte del SA sintetizado en las plantas es glicosilado y/o metilado (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). La glicosilación es llevada a cabo por glicosiltransferasas presentes en el citosol, y los niveles de estas enzimas, al igual que los niveles de SA, aumentan frente al ataque de patógenos en plantas de *Arabidopsis* (Song, 2006), demostrando que el SA funciona como una molécula señal ante el estrés biótico. Además, el SA puede mediar la respuesta de las plantas frente a diferentes tipos de estreses abióticos, como la sequía, las temperaturas extremas, la tolerancia a metales pesados y el estrés osmótico (Revisados en Khan y col., 2015).

Existen evidencias de que el ácido salicílico cumple roles en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como por ejemplo en la germinación, el crecimiento vegetativo, la fotosíntesis, la respiración, la floración y la senescencia (Revisados en

Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011). El rol del SA en el crecimiento de las plantas se ha estudiado poco en comparación con el de otras hormonas, sin embargo plantas mutantes de *Arabidopsis* que muestran niveles elevados de SA presentan un fenotipo de enanismo que se debe a que poseen una menor cantidad y tamaño de células (Sasek y col., 2014); mientras que plantas mutantes que presentan deficiencias en los niveles de SA mostraron mayor velocidad de crecimiento que las plantas salvajes (Abreu y Munné-Bosch, 2009).

3.1.1.1.1.7 Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BRs) son hormonas esteroides específicas de las plantas caracterizadas por su estructura esteroide polihidroxilado. Los BRs son hormonas vegetales esenciales que desempeñan diversas funciones en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, por ejemplo durante la germinación de las semillas, la elongación celular, la división celular, la senescencia, la diferenciación vascular, la reproducción, el desarrollo de las raíces, la fotomorfogénesis, y también responden a diversos estreses bióticos y abióticos (Nakaya y col., 2002; Bajguz y Hayat, 2009; Cheon y col., 2010; Wang y col., 2011).

La biosíntesis de BRs, el transporte y la degradación son componentes críticos en la homeostasis de los brasinoesteroides para mantener los niveles endógenos mínimos para diversas funciones biológicas de las plantas. Mutantes deficientes en los niveles de BRs exhiben enanismo, alteración en la morfología de las hojas, retraso en la floración y la senescencia (Cheon y col., 2010; Clouse, 2011), demostrando que los niveles de estas hormonas son importantes durante el desarrollo de las plantas.

3.1.1.1.1.8 Ácido Jasmónico

El ácido jasmónico y sus sales derivadas o jasmonatos (JAs) son moléculas señal derivadas de lípidos que regulan diversos procesos del desarrollo así como también distintas respuestas frente a estreses bióticos y abióticos en plantas (Wasternack y Hause, 2013; Ahmad y col., 2016). La inhibición del crecimiento de la raíz y la senescencia fueron las primeras respuestas fisiológicas descritas para los JAs (Ueda y Kato, 1980; Staswick y col., 1992). Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que los jasmonatos actúan en conjunto con otras hormonas para regular distintos procesos del desarrollo (Ubeda-Tomás y col., 2012). Por ejemplo, en *Nicotiana attenuata*, altos niveles de jasmonatos inhiben la biosíntesis de giberelinas y consecuentemente inhiben el crecimiento del tallo (Heinrich y col., 2013).

Los JAs son producidos a partir de fosfolípidos como el ácido linolénico y α -linolénico, los cuales son liberados de las membranas de los cloroplastos a través de la acción de fosfolipasas (Lyons y col., 2013). Esto proporciona sustratos para los

pasos posteriores de dioxigenación catalizadas por lipooxigenasas (LOXs), que conllevan a la formación del ácido hidroperoxioctadecadienoico (HPODE). Los HPODEs, luego de varios pasos enzimáticos, son convertidos en ácido jasmónico. Las lipooxigenasas de plantas tradicionalmente han sido clasificadas según la posición en la que se oxida la cadena principal hidrocarbonada de los fosfolípidos, ya sea en la posición C-9 o C-13. En monocotiledóneas, se han caracterizado enzimas no convencionales con la capacidad dual de oxidar en las dos posiciones; ejemplos de ellas son ZmLOX1, OsLOX1 y la lipooxigenasa de maíz conocida como TASSELSEED1 (Lyons y col., 2013).

3.1.1.1.2 Factores de transcripción Growth Regulating Factors (GRFs)

Los factores de transcripción GRFs son una familia pequeña de factores de transcripción específicos de las plantas. A pesar de que en los primeros estudios se identificaron roles de los GRFs únicamente durante el desarrollo de las hojas y los tallos (van der Knaap y col., 2000; Kim y col., 2003), más recientemente se encontraron otras funciones durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas, como en la floración, en el desarrollo de la semilla y la raíz, en el control del crecimiento ante condiciones de estrés y en la regulación de la longevidad de las plantas (Rodríguez y col., 2010; Hewezi y col., 2012; Baucher y col., 2013; Casadevall y col., 2013; Liu y col., 2014; Vercruyssen y col., 2015). Los factores de transcripción GRFs forman un complejo con los coactivadores transcripcionales GIF (del inglés “GRF-interacting factors”) y en *Arabidopsis*, siete de los nueve miembros de la familia GRF son blancos del microARN396 (miR396) (Omidbakhshfard y col., 2015).

Al igual que las hormonas, los factores de transcripción GRFs son reguladores esenciales del crecimiento de las hojas (Kalve, De Vos, y col., 2014). Plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *GRF1* o *GRF2* mostraron hojas más grandes que las de plantas salvajes, mientras que plantas triple mutantes nulas *grf1/2/3* poseen hojas más pequeñas y angostas (Kim y col., 2003). Por otro lado, plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el miR396 mostraron una disminución en los niveles de transcritos que codifican algunos GRFs, lo que trae como consecuencia una severa inhibición de la división celular, dando plantas con hojas más chicas que las de las plantas salvajes (Liu y col., 2009). Por último, Rodríguez y col. (2010) mostraron que plantas de *Arabidopsis* con niveles aumentados de TCP4, el cual reduce la proliferación celular en hojas, poseen mayores niveles del miR396 y menores niveles de los factores de transcripción GRFs, demostrando que una interconexión entre la vía de los TCP y GRFs podría regular la proliferación celular en plantas.

3.1.2 Efecto de la radiación UV-B en el desarrollo de las hojas

Como se expuso anteriormente, la inhibición del crecimiento es una de las respuestas más consistentes de la exposición de las plantas a la radiación UV-B; y esta radiación, ya sea suministrada por la luz solar o a través de lámparas de UV-B, limita el crecimiento de la hoja en una gran variedad de especies. Muchos estudios se han realizado para intentar entender este efecto, pero la mayoría de ellos se realizaron utilizando hojas maduras, en donde la división celular y la expansión celular ya finalizaron (Casati y Walbot, 2003; Kakani y col., 2003; Reddy y col., 2013; Martínez-Lüscher y col., 2015). Además, la información disponible acerca de los efectos de la radiación UV-B en la proliferación y la expansión celular es contradictoria, probablemente por diferencias en las condiciones experimentales. Por un lado, altas dosis de UV-B inhiben la proliferación celular, mientras que dosis crónicas de baja intensidad afectan tanto la proliferación como la expansión celular (Hopkins y col., 2002; Kakani y col., 2003; Rousseaux y col., 2004; Hectors y col., 2010). Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que la exposición de hojas de *Arabidopsis* con células en proliferación activa a dosis de UV-B que causan daño en el ADN inhibe la expansión de las hojas como consecuencia de la inhibición de la proliferación celular y no de la expansión celular (Casadevall y col., 2013). Además, en el año 2003, Casati y Walbot describieron que plantas de maíz crecidas a campo en presencia de radiación solar, incluida la radiación UV-B, sufren una inhibición del crecimiento, en comparación a plantas controles crecidas en condiciones similares pero a las cuales se les filtró el UV-B con plásticos que absorben esta radiación.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general:

Estudiar el efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de la hoja de maíz

3.2.2 Objetivos particulares:

1. Evaluar si el UV-B afecta el tamaño final de la hoja número 4 de plantas de maíz B73 y la velocidad de elongación de la hoja.
2. Analizar los mecanismos que se ven alterados a nivel celular.
3. Comparar el transcriptoma de plantas crecidas en presencia y ausencia de UV-B.
4. Medir las concentraciones de diferentes hormonas en hojas control y tratadas con radiación UV-B.
5. Estudiar el rol de *ZmGRF1* en el crecimiento de las plantas frente al UV-B utilizando plantas sobreexpresantes de *GRF1* insensibles al miR396.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En primer lugar, se trabajó con la línea de maíz salvaje B73 obtenida del Maize Genetics Stock Center (<http://www.aces.uiuc.edu/maize-coop/>). Las semillas se sembraron en vasos plásticos individuales conteniendo tierra y se colocaron al aire libre durante la época de verano del año 2013 en Rosario, Argentina. A las plantas control se las cubrió con un filtro plástico de poliéster (plástico de poliéster claro de 100 μm) que absorbe la radiación UV-B sin disminuir significativamente las radiaciones UV-A o visible, mientras que las plantas que recibieron radiación UV-B se cubrieron con un filtro de acetato de celulosa, que no absorbe dicha radiación, para que no haya variación de temperatura y humedad entre ambos tratamientos. La radiación suministrada en los experimentos fue registrada usando un detector de radiación UV-A y UV-B (Ultraviolet Radiometer Modelo UV203, Macam Photometrics Ltd.). El promedio de radiación UV-A recibida por ambos grupos de plantas un día soleado fue de 11 a 13 W.m^{-2} , mientras que el promedio de radiación UV-B recibida por las plantas control un día soleado fue de 0,4 a 0,6 W.m^{-2} , mientras que la experimentada por el grupo expuesto a dicha radiación fue de 2 a 2,2 W.m^{-2} .

En segundo lugar, se trabajó con plantas de maíz que sobreexpresan el factor de transcripción GRF1 insensible al miR396 (denominadas GRF1^R) (Nelissen y col., 2015) y con semillas *dwarf3*, mutantes en la conversión de giberelinas activas (Nelissen y coll., 2012). Las semillas se sembraron en vasos plásticos individuales conteniendo tierra; y en los experimentos utilizando estas plantas, los tratamientos con UV-B fueron realizados en invernadero en condiciones de temperatura y humedad controladas, utilizando lámparas (Bio-Rad) que emiten radiación UV-B a una intensidad de 0,7 W.m^{-2} durante 8 h diarias. Las plantas control fueron expuestas durante el mismo período de tiempo pero las lámparas se cubrieron con un filtro plástico de poliéster (plástico de poliéster claro de 100 μm) que absorbe la radiación UV-B sin disminuir significativamente las radiaciones UV-A o visible.

3.3.2 Análisis cinemático

3.3.2.1 Medida de la velocidad de elongación y de la longitud final de la hoja #4

Las medidas de la velocidad de elongación y de la longitud final de la hoja se realizaron utilizando la hoja #4. Una vez emergida las mismas, se registró su longitud una vez al día utilizando el nivel de tierra como punto de referencia. Las medidas fueron registradas para 20 plantas control y 20 plantas crecidas en presencia de UV-B. La velocidad de elongación se calculó para cada hoja individual como la pendiente de

la recta de regresión ajustada a través de los datos obtenidos a las 24, 48 y 72 h (período de crecimiento lineal). Los datos fueron promediados entre las hojas y la velocidad de elongación de las hojas se utilizó para los cálculos posteriores. Una vez que la hoja #4 finalizó su elongación, se registró este valor como longitud final.

3.3.2.2 Medida de la longitud de las células epidérmicas y estimación de la longitud del meristema

El tercer día de crecimiento constante de la hoja #4, 12 plantas de cada condición (control y UV-B) fueron cosechadas del mismo lote de plantas que se utilizó para la determinación de la velocidad de elongación.

Se colectaron los primeros 10 cm de la base hacia la punta de la hoja #4 de cada una de las plantas y se fraccionaron en 10 segmentos de 1 cm cada uno. Estos segmentos se dividieron en dos partes iguales, las cuales se utilizaron para obtener la longitud promedio de las células epidérmicas y para la estimación promedio de la longitud del meristema.

Para la medida de la longitud de las células epidérmicas, los segmentos se guardaron en etanol absoluto durante 48 h para la remoción de las clorofilas y la fijación del tejido. Posteriormente, se tomaron imágenes sucesivas de cada segmento en el microscopio óptico (DIC, del inglés, Differential Interference Contrast) Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japón) con una cámara digital Nikon digital Sight DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón), utilizándose el objetivo 40x para la observación de las células meristemáticas y en elongación, y el objetivo 20x para la observación de las células maduras. Por último, se determinó la longitud de las células utilizando el programa Image J, y estos valores fueron utilizados posteriormente para realizar el análisis cinemático.

La estimación del tamaño de la zona meristemática se realizó midiendo la distancia desde la base de la hoja hasta la última figura mitótica. Para ello, los segmentos fueron incubados durante una semana en una solución 3:1 (v/v) de etanol absoluto: ácido acético para la fijación de las paredes celulares y remoción de la clorofila. Luego, las muestras se enjuagaron con un buffer que contenía 50mM NaCl, 5mM EDTA y 10mM TRIS-HCl a pH 7.0. Para la visualización de los núcleos, los segmentos fueron teñidos en oscuridad durante 10 minutos con el mismo buffer conteniendo $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Los núcleos fluorescentes fueron observados en un microscopio con un condensador fluorescente, y estas imágenes permitieron estimar el tamaño de meristema, definido como la distancia entre la base de la hoja y la célula mitótica más distal.

3.3.2.3 Estimación de los parámetros de crecimiento

Se calcularon los parámetros de crecimiento a través de un análisis cinemático, como se describió en Fiorani y col. (2000) y en Rymen y col. (2010).

La distribución de la longitud de la célula a lo largo del eje de la hoja se obtuvo trazando la longitud de cada célula en función de la posición con respecto a la base de la hoja. Los datos de todos los puntos se combinaron para cada hoja y luego se interpolaron utilizando el método de Kernel (Beemster y Baskin, 1998). De esta manera, se obtuvieron los perfiles de longitud de la célula para cada hoja. El algoritmo de interpolación se realizó utilizando el programa R.

Observando el perfil de la longitud de las células interpoladas para cada hoja, las longitudes de células maduras (l_m) se calcularon haciendo un promedio de las longitudes de las células de los puntos más distales cuando el aumento de la longitud entre los puntos sucesivos fue $0 \mu m$. La longitud de la zona de crecimiento (L_{dez}) se estimó como la distancia desde la base de la hoja hasta la posición en la que las células alcanzaron el 95% de su longitud madura.

En base a las medidas de la velocidad de elongación de la hoja y en el perfil celular, se realizó el análisis cinemático de la elongación de la hoja. La posición de cada dato de longitud de célula interpolada como una función de la distancia desde la base de hoja se definió como: $X = n \times \Delta x$, donde $n = 1, 2, 3$, etc.; y Δx representa $25 \mu m$. La cantidad de células en la zona de crecimiento (N_{dez}) y en la zona de división (N_{div}) se calculó a partir de la densidad celular local, $\rho(x)$, la cual es recíproca a la longitud celular local, aplicando la siguiente fórmula:

$$N_{dez, div} = \Delta x \times \sum [\rho(n\Delta x + \rho(n-1)\Delta x)] / 2$$

Donde la sumatoria se detuvo en el margen distal de la zona de crecimiento y de la zona de división, respectivamente.

El tamaño (L_{ez}) y la cantidad de células en la zona de elongación (N_{ez}) se determinaron como:

$$L_{ez} = L_{dez} - L_{div}$$

$$N_{ez} = N_{dez} - N_{div}$$

Por otro lado, determinamos la producción de células como:

$$P = \frac{LER}{l_m}$$

donde LER es la velocidad de elongación de la hoja y l_m es el tamaño de las células maduras.

Teniendo en cuenta la naturaleza exponencial del proceso de división celular, la duración media del ciclo celular (T_c) se calculó como:

$$T_c = \ln(2) \times \frac{N_{div}}{P}$$

El tiempo de residencia en la zona de elongación es proporcional a la cantidad de células en esta región (Nez) y al intervalo de tiempo tomado para que una nueva célula se agregue a la zona. Dado que P es recíproco a este tiempo, el tiempo de residencia en la zona de elongación (Tez) se estimó como:

$$T_{ez} = \frac{N_{ez}}{P}$$

3.3.3 Análisis de daño en el ADN utilizando la técnica de dot blot

Se utilizó el mismo protocolo para detectar dímeros de pirimidinas por formación de anillo de ciclobutano (CPDs) descrito para plantas de Arabidopsis en la sección 2.3.10.1. Para ello, muestras de hoja que correspondían a la zona madura (Granier y Tardieu, 2009) se colectaron 3 días luego de la emergencia de la hoja, durante el crecimiento en estado estacionario, y las mismas fueron inmersas inmediatamente en N₂ y conservadas a -80 °C. El ADN se extrajo utilizando el método de CTAB descrito en la sección 2.3.4.1.

3.3.4 Extracción de ARN

Como se describe en la sección 3.3.2.2, se colectaron los primeros 10 cm de la base hacia la punta de la hoja #4 de las plantas a analizar, y se diseccionaron en 10 segmentos de 1 cm cada uno. Se extrajo el ARN total de los 3 primeros segmentos de 3 hojas utilizando el protocolo descrito en la sección 2.3.4.2. Luego, 1 mg de ARN total se incubó con ADNasa I libre de ARNasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega) para eliminar el posible ADN genómico. El ARN obtenido se utilizó para los experimentos de transcriptómica.

3.3.5 Experimentos de transcriptómica

El ARN obtenido se analizó por experimentos de ARNseq utilizando la tecnología Illumina™, en el laboratorio del Dr. Beemster en la Universidad de Amberes, Bélgica. El experimento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Illumina Inc., 2013, 2014).

Una vez obtenido el ARN en las condiciones necesarias se procedió a construir las bibliotecas utilizando el kit TruSeq™ RNA Sample Preparation Guide (Illumina). Para ello, se usaron 2,5 µg de ARN total, a partir del cual se purificó y fragmentó el ARN poliadenilado. El ADNc fue sintetizado utilizando una enzima transcriptasa reversa incluida en el kit y hexámeros al azar. A continuación, el ARN fue degradado y se sintetizó el ADN doble cadena. La reparación de los extremos y la adición de un

nucleótido de adenina al extremo 3' posibilitaron la ligación de secuencias adaptadoras que luego permitieron identificar a qué muestra correspondía cada secuencia generada. Finalmente, las muestras fueron amplificadas con 12 ciclos de reacción de PCR utilizando cebadores complementarios a las secuencias adaptadoras. Luego, la concentración de las bibliotecas fue cuantificada utilizando la tinción PicoGreen® (Life Technologies™). Con el fin de cuantificar con precisión la concentración en nM de los oligonucleótidos, se utilizó el kit Kapa SYBR® FAST universal qPCR (Kapa Biosystems™), y para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies™). Para el análisis de las secuencias se utilizó el secuenciador Illumina HiSeq 1500. Las muestras fueron secuenciadas por el método de paired-end con el TruSeq® SBS Kit, compatible con la plataforma Illumina HiSeq 1500. Se obtuvieron alrededor de 5 millones de lecturas para cada muestra. Se secuenciaron tres réplicas por condición.

Una vez obtenidas las secuencias, diferentes paquetes informáticos fueron utilizados para determinar los genes que presentaron expresión diferencial. Entre ellos, el paquete CLC Genomics workbench, versión 6 y la base de datos de *Zea Mays* (RefGen V3; <http://www.maizegdb.org>) se usaron para el proceso de alineamiento y estimación de valores RPKM (del inglés "Reads Per Kilobase of transcript per Million reads mapped") (Mortazavi y col., 2008). Los valores de RPKM estimados para cada una de las secuencias fueron utilizados en el programa MeV (Multi Experiment Viewer 4.9.0) para realizar un ANOVA a dos criterios e identificar los genes que presentaron una expresión diferencial entre los tratamientos (control y UV-B) y entre las zonas de crecimiento. Los valores de p obtenidos se corrigieron utilizando múltiples pruebas para calcular el FDR (del inglés "False Discovery Rate"), con el objeto de reducir la probabilidad de detectar falsos positivos, usando sólo genes para los cuales se detectó expresión en las tres repeticiones en al menos un tratamiento. Un FDR < 0.05 en combinación con un LogFC (del inglés "Fold Change") de 0,75 se utilizó para seleccionar los genes que se encontraban afectados significativamente.

3.3.6 Cuantificación de los niveles de las fitohormonas

Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio de la Dra. Els Prinsen, en la Universidad de Amberes, Bélgica.

3.3.6.1 Extracción de hormonas ácidas

Para la extracción de ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y giberelinas (GA), las hojas fueron maceradas en nitrógeno líquido y sumergidas en metanol 80% (v/v) durante toda la noche. Luego se

añadieron patrones de fitohormonas adecuadamente deuterizados en las cantidades definidas: C₆¹³-fenil-IAA (100 pmol, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, Massachusetts, USA), D₆-ABA (150 pmol, [²H₆](+)-*cis,trans* ABA (OChemIm, Olomouc, Czech Republic), 100 pmol [²H₄]-SA (OChemIm), 100 pmol dihidro-ácido jasmónico (OChemIm) y 20 pmol [²H₂] giberelina A19 (OChemIm).

Previo a la separación y el análisis de las distintas hormonas se realizó un paso de purificación utilizando una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para remover los pigmentos. Para ello se utilizó una columna cromatográfica C18 (Bond Elut C18 500 mg, 6 cc, Agilent, CA, USA), previamente acondicionada con metanol 80% (v/v). El extracto se acidificó con ácido fórmico 6% (v/v) de manera que las hormonas queden retenidas con la fase estacionaria de la columna C18. Las hormonas fueron luego eluidas de la columna con éter dietílico. El agua residual fue removida y la fase etérea del eluido fue evaporada con una corriente de N₂ (Turbovac LV Evaporator, Hopkinton, MA, USA). Luego, las hormonas se metilaron con diazometano y las muestras se secaron utilizando una corriente de N₂. Por último, las muestras fueron disueltas en hexano 100% (v/v) para el análisis de SA y JA a través de cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa en tándem (GC-MS/MS). Luego del análisis de JA y SA, el remanente de las muestras se secó nuevamente y fue re-disuelto en 50 µl de metanol 10% (v/v) para el análisis de IAA, ABA y GA por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa en tándem (LC-MS/MS).

3.3.6.1.1 Análisis de JA y SA

Para la análisis de JA y SA se empleó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 Network GC System, acoplado a un detector selectivo de masas Waters Micromass Quattro micro GC (Waters; MA, USA). El proceso de separación se llevó a cabo utilizando una columna capilar DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 15 m x 0,25 mm, el volumen de inyección fue de 10 µl, el gas portador utilizado fue helio y la velocidad de flujo fue 1ml.min⁻¹. La temperatura del horno se programó desde 50°C (2 min) hasta 300 °C (3 min) a 25 °C min⁻¹.

Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV) mediante «Multiple Reaction Monitoring» (MRM). La cuantificación se realizó utilizando la relación masa/carga (m/z) de los iones diagnósticos detallados a continuación: m/z 152>120 para MeSA, m/z 156>124 para D₄-MeSA, m/z 224>151 para MeJA y m/z 226>153 para DHMeJA. Los datos fueron expresados en pmol por gramo de peso fresco.

3.3.6.1.2 Análisis de IAA, ABA y GA

Las giberelinas, el IAA y el ABA fueron analizados por UPLC-MS/MS, utilizando para la cromatografía una columna ACQUITY BEHC18 de 1.7 μm (WATERS). La elución de las hormonas se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: caudal 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 2 minutos del solvente 95/5 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH, a continuación un gradiente lineal 10/90 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH y por último dos minutos del solvente 10/90 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH de manera isocrática. Las condiciones del espectrómetro de masas (Acquity TQD, Waters, Manchester, UK) fueron: modo ion positivo con una energía de colisión de 20 eV, temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 450°C, flujo del gas de desolvatación: 750 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$, flujo del gas de colisión: 0,19 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Los iones diagnósticos utilizados para la cuantificación fueron: m/z 190>130 para Me-IAA, m/z 196>136 para Me- C^{13} -IAA, m/z 279>173 para Me-ABA y m/z 285>179 para D_6 -Me-ABA, m/z 393>300 para GA19-Me y m/z 391>298 para D_2 -GA19-Me. Los datos fueron expresados en pmol por gramo de peso fresco.

3.3.6.2 Extracción y análisis de las citoquininas

Para la extracción de las citoquininas, las hojas fueron maceradas en nitrógeno líquido y sumergidas en metanol 80% (v/v) durante toda la noche. Luego se agregaron estándares internos de fitohormonas adecuadamente deuterizados en las cantidades definidas: [$^2\text{H}_3$] dihidrozeatina (D-DHZ) y [$^2\text{H}_6$] N^6 -Isopenteniladenosina (D-iPA) (10 pmol, OlChemIm).

En primer lugar, se centrifugaron las muestras (15 min a 20000g y 4°C, 5810R, rotor FA-45-30-11 Eppendorf, Hamburg, Germany) y al sobrenadante se le realizó una etapa de purificación utilizando una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para remover los pigmentos como se describe en el punto 3.3.6.1. A continuación, las muestras se secaron utilizando un concentrador (Christ RNC2-25, Germany) y por último, se disolvieron en 50 μl de MeOH 10% (v/v) para el análisis.

Las citoquininas isoprenoides fueron analizados por UPLC-MS/MS, utilizando para la cromatografía una columna ACQUITY BEHC18 de 1.7 μm (WATERS), utilizando una temperatura de 30°C y un flujo de 400. La elución de las citoquininas isoprenoides se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: caudal 0,4 ml/min , 0,5 min del solvente 95/5 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH, a continuación un gradiente lineal 75/25 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH durante 2,5 min, luego 1 min del solvente 75/25 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH de manera isocrática, y por último otro gradiente lineal 5/95 de MeOH 10% (v/v) en NH_4OAc 1mM/MeOH durante 0,5 min. Las condiciones del espectrómetro de masas

(Acquity TQD, Waters, Manchester, UK) fueron: modo ion positivo con una energía de colisión de 20 eV, temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 400°C, flujo del gas de desolvatación: 800lh⁻¹, flujo del gas de colisión: 0,22 mlmin⁻¹. La cuantificación se realizó utilizando la relación masa/carga (m/z) de los iones diagnósticos detallados a continuación: m/z 225 > 136 para dihidrozeatina deuterada (d-DHZ), m/z 220 > 136 para cis-Zeatina (cis-Z), m/z 342 > 210 para isopenteniladenosina deuterada (D-IPA), m/z 336 > 204 para isopenteniladenosina (IPA).

Las citoquininas aromáticas fueron analizadas por UPLC-MS/MS, utilizando para la cromatografía una columna ACQUITY BEHC18 de 1.7 µm (WATERS), utilizando una temperatura de 40°C y un flujo de 550. La elución de las citoquininas aromáticas se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: caudal 0,55 ml.min⁻¹, 1 min del solvente 100/0 de MeOH 10% (v/v) en NH₄OAc 1mM/MeOH, a continuación un gradiente lineal 72/28 de MeOH 10% (v/v) en NH₄OAc 1mM/MeOH durante 4 min, luego 0,5 min de un gradiente lineal del solvente 0/100 de MeOH 10% (v/v) en NH₄OAc 1mM/MeOH, y por último 0,5 min de un solvente isocrática MeOH 100% (v/v). Las condiciones del espectrómetro de masas (Acquity TQD, Waters, Manchester, UK) fueron: modo ion positivo con una energía de colisión de 12 eV, temperatura de la fuente: 120°C, temperatura de desolvatación: 400°C, flujo del gas de desolvatación: 800lh⁻¹, flujo del gas de colisión: 0,22 ml.min⁻¹. La cuantificación se realizó utilizando la relación masa/carga (m/z) del ion diagnóstico detallado a continuación: m/z 404>242 para *para*-topolin-9-glucosido (pT9G).

3.4 Resultados

3.4.1 *Efectos de la radiación UV-B en el crecimiento de la hoja de maíz*

Como fue descripto en la Introducción general, la radiación UV-B afecta varios procesos del desarrollo y modifica la arquitectura de las plantas. En general, luego de la exposición con UV-B, se observa una reducción de la biomasa y reducción del largo y área de las hojas (Farooq y col., 2005; Zinser y col., 2007; Casadevall y col., 2013; Reddy y col., 2013; Takshak y Agrawal, 2014); sin embargo, las respuestas inducidas por la radiación UV-B varían ampliamente dependiendo del tipo de tratamiento realizado. Previamente en nuestro laboratorio demostramos que la exposición de plantas de *Arabidopsis*, una especie dicotiledónea, con radiación UV-B a una intensidad de 2 W.m^{-2} durante 4 h, produce la inhibición del crecimiento de las hojas en proliferación activa, como consecuencia de una inhibición temprana de la proliferación celular (Casadevall y col., 2013). En este capítulo de la Tesis, nos interesó estudiar el efecto de la radiación UV-B en el desarrollo de las hojas de maíz, una especie monocotiledónea. Los experimentos fueron realizados utilizando la radiación solar como fuente de UV-B, para que las condiciones experimentales sean similares a las de los cultivos de la zona.

Para ello, plantas de maíz fueron crecidas recibiendo radiación solar como fuente de luz durante el verano, y el crecimiento de las mismas se comparó con el de plantas control a las cuales se les filtró el UV-B con plásticos de poliéster que absorben dicha radiación. Se eligió al azar la hoja #4 como modelo de estudio para el análisis de crecimiento. Las plantas expuestas al UV-B fueron cubiertas con un filtro de acetato de celulosa que deja pasar la radiación UV-B para mantener condiciones de humedad y temperatura similares a las de plantas control. La intensidad de radiación UV-A y UV-B fue registrada todos los días, y los resultados se muestran en la Figura 49. En primer lugar, se midió el largo de la hoja #4, tanto de plantas control como de las plantas expuestas a radiación UV-B. Este tratamiento resultó en una reducción del 13% ($P < 0.05$) en el tamaño final de las hojas de plantas expuestas al UV-B en comparación al de las hojas de plantas crecidas en ausencia de UV-B (Figura 50). En segundo lugar, se determinó la velocidad de elongación de la hoja #4 durante los tres días luego de su emergencia, tiempo durante el cual el crecimiento se encuentra en la fase de estado estacionario. Este ensayo mostró que la velocidad de crecimiento de la hoja #4 fue 30% menor en las plantas expuestas a la radiación UV-B ($P < 0.001$) que en las plantas control (Figura 51).

Por otra parte, se midió el daño en el ADN en hojas maduras de plantas crecidas en ausencia y presencia de UV-B. Resultó interesante observar que las plantas expuestas al UV-B no mostraron acumulación de daño en el ADN, sugiriendo que los

sistemas de reparación del ADN se encuentran activos bajo las condiciones ensayadas, y la acumulación del daño en el ADN no sería la causa de la inhibición del crecimiento de las hojas observada (Figura 52).

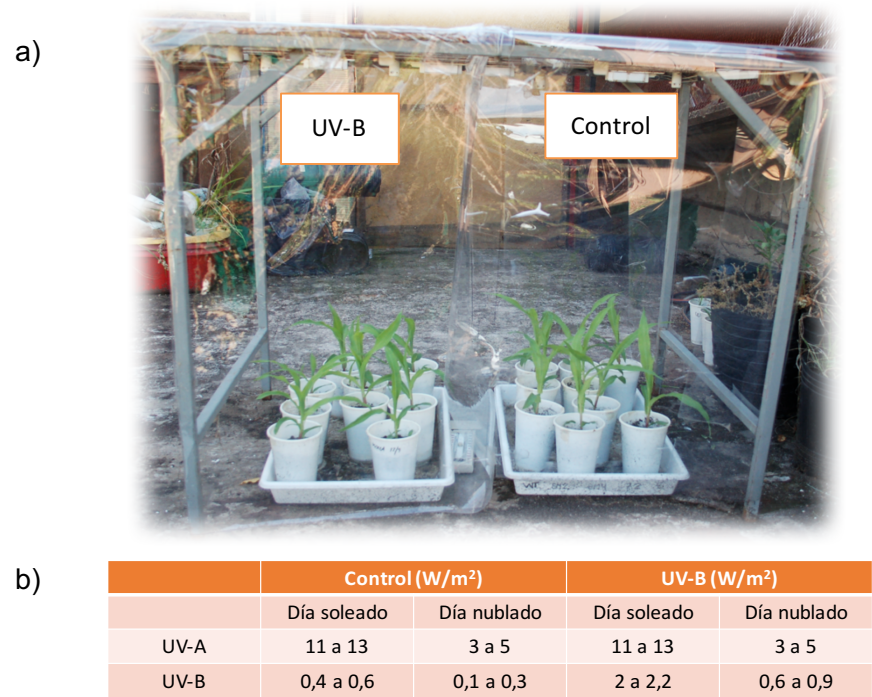


Figura 49: Experimento realizado utilizando a la radiación solar como fuente de UV-B. a) Foto del dispositivo utilizado para los tratamientos. Del lado izquierdo de la imagen se encuentran las plantas crecidas en presencia de UV-B cubiertas con un filtro de acetato de celulosa y del lado derecho se encuentran las plantas crecidas en ausencia de UV-B (plantas control). b) Tabla con las intensidades promedios de UV-A y UV-B medidas en días nublados y soleados.

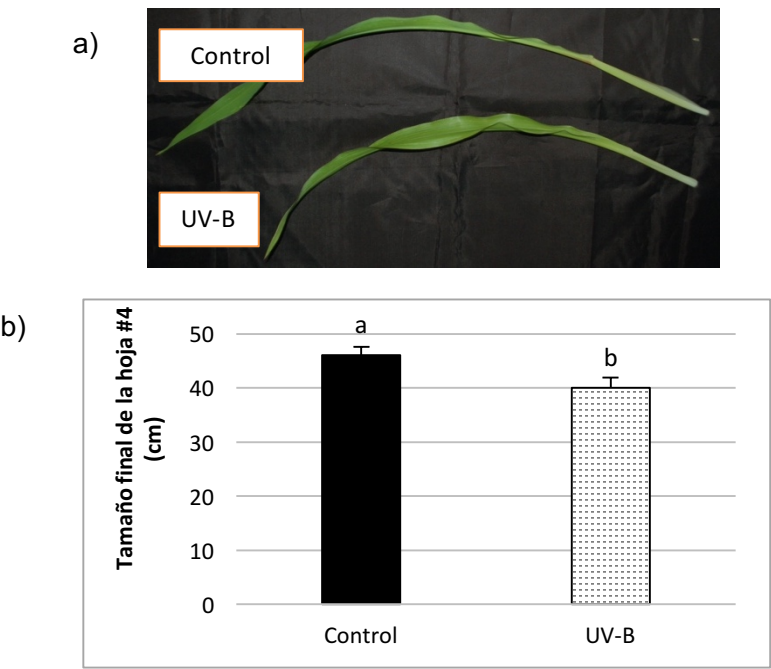


Figura 50: Efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de las plantas de maíz. a) Foto de la hoja #4 de plantas de maíz crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B (Control) y en presencia de UV-B (UV-B). b) Longitud de la hoja #4 de plantas crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B y en presencia de UV-B. Las letras muestran diferencias sianificativas. al aplicar t de student con un $p < 0.05$.

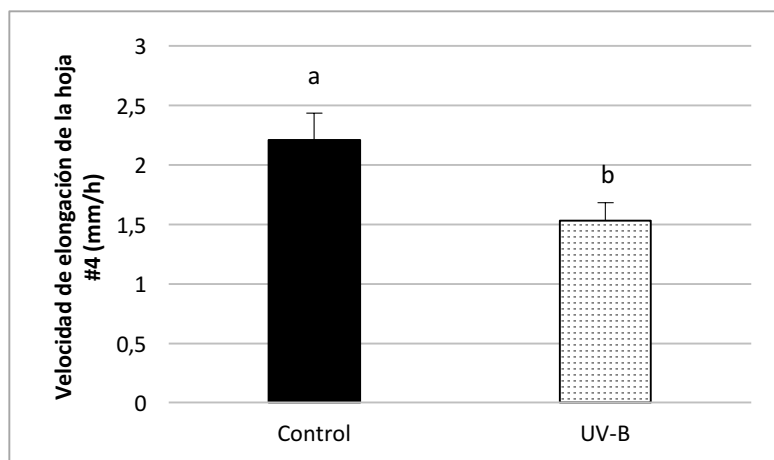


Figura 51: Velocidad de elongación de la hoja #4. Se determinó el largo de la hoja #4 tres días luego de su emergencia de plantas crecidas en ausencia de UV-B (plantas control) y en presencia de radiación UV-B (UV-B). Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar t de student con un $p < 0,05$.

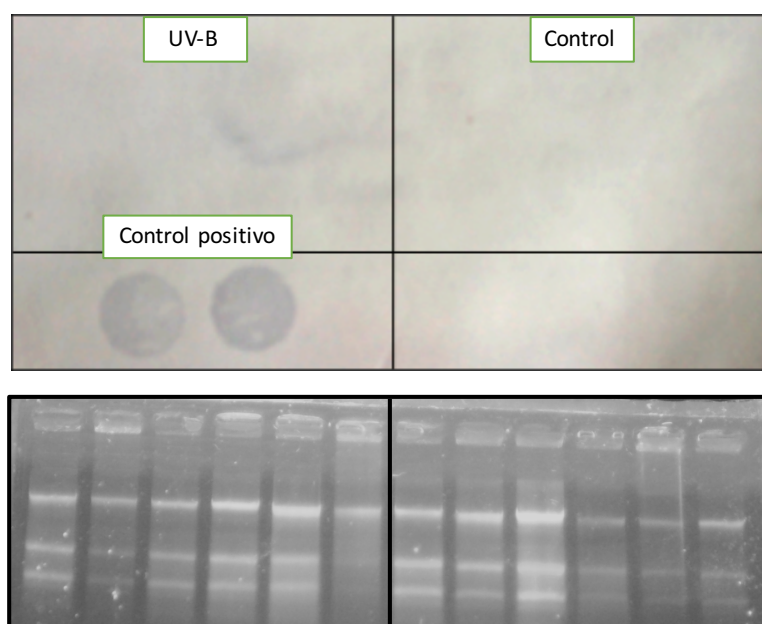


Figura 52: Ensayo de dot blot para determinar los niveles de acumulación de dímeros de pirimidina por UV-B. A) Dot blot utilizando anticuerpos anti-DPCs para la determinación del daño en el ADN en plantas expuestas (UV-B) y no expuestas (control) a la radiación UV-B. B) Gel de agarosa 1% en donde se sembró 1 ug de ADN. Se utilizaron dos plantas de Arabidopsis tratadas bajo lámparas de UV-B durante 4 h a 2 W.m^{-2} como control positivo del ensayo de dot blot.

3.4.2 *Análisis cinemático*

A fin de dilucidar cómo los procesos que ocurren a nivel celular contribuyen a las diferencias en los parámetros macroscópicos observadas, se realizó un análisis cinemático del crecimiento. Este ensayo permitió estimar diversos parámetros de crecimiento como el número de células en la DEZ, en la EZ y en el total de células maduras, la velocidad de división y de expansión celular, y el tamaño promedio de las células en cada estadio (células en división, células en elongación, células maduras). Para realizar este estudio fue necesario establecer primero un perfil de tamaños celulares a lo largo de la hoja, para luego calcular los parámetros de crecimiento.

Para establecer el perfil celular a lo largo de la hoja, se midió la longitud de las células epidérmicas en función de la posición de la hoja. Para ambos tratamientos (control y UV-B) el perfil de longitud celular mostró una forma típica con dominios distintivos (Figura 53): en la base de la hoja se observa una zona en la cual las células tienen un tamaño constante y donde se produce simultáneamente la división y expansión celular ("DEZ"), y en las posiciones más distales se observa que las células aumentan considerablemente su tamaño debido a la expansión celular en ausencia de actividad mitótica ("EZ"). Por último, se observa una región donde se alcanza un tamaño celular constante, y las células no se dividen ni se expanden ("MZ").

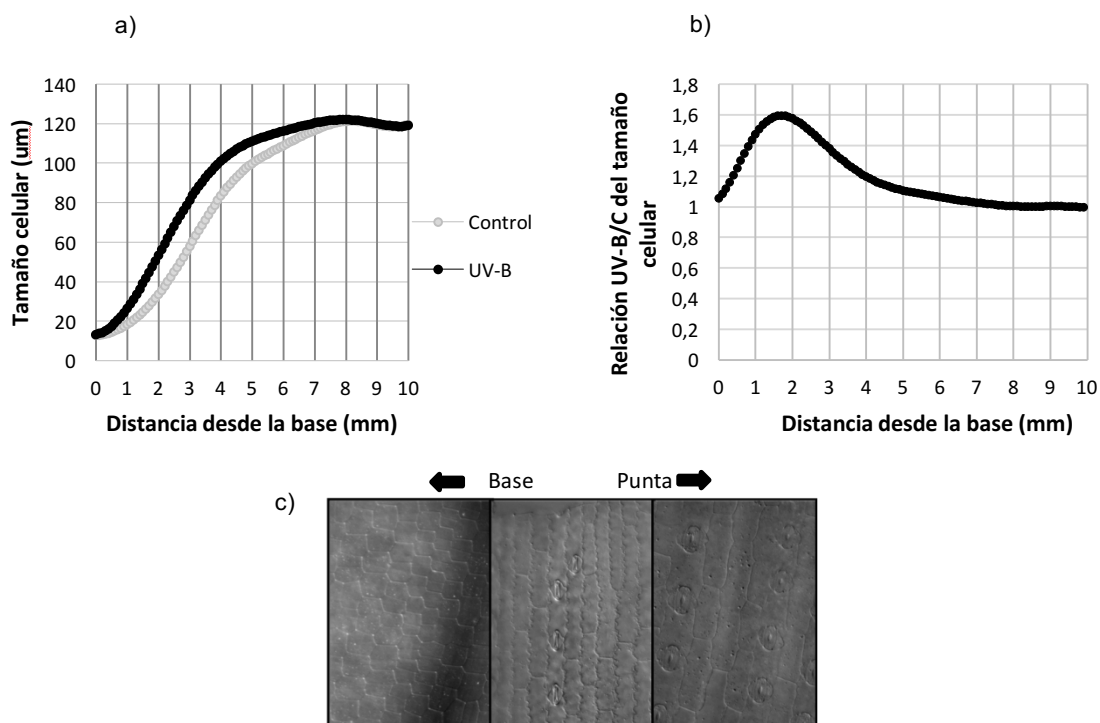


Figura 53: Efecto de la radiación UV-B en la longitud de las células epidérmicas. a) Longitud celular de las plantas control (negro) y las plantas expuestas a la radiación UV-B (gris) en función de la distancia desde la base de la hoja. b) Relación UV-B/C de la longitud celular en función de la distancia desde la base de la hoja. c) Imagen representativa de los diferentes tamaños celulares desde la base hacia la punta de la hoja.

En la Figura 53 se observa que, tanto las hojas de plantas expuestas al UV-B como las hojas de plantas control, hacia la base poseen un largo celular similar de aproximadamente 13 μm . Sin embargo, a medida que se avanza hacia la punta de la hoja, las hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B tienen células de mayor tamaño en la misma posición que las hojas de plantas no expuestas a dicha radiación (Figura 53b). Hacia la punta de la hoja, se observa que las células maduras de las hojas de plantas expuestas al UV-B y de plantas control poseen un tamaño similar de aproximadamente 120 μm .

A continuación se estimaron los parámetros de crecimiento. La Tabla IV muestra que el tamaño de la EZ y la longitud de las células maduras no varían significativamente entre las hojas de plantas expuestas y no expuestas a la radiación UV-B, indicando que el menor tamaño de las hojas expuestas al UV-B se debe específicamente a una reducción de la producción celular. Además, cuando se comparó la velocidad de producción celular en la zona de crecimiento, se observó que la hoja #4 de las plantas expuestas a la radiación UV-B posee una reducción del 37% de este parámetro en comparación a la de hojas de plantas control (15,43 células/hora vs 24,31 células/hora, Tabla IV). La reducción en la producción celular podría deberse a que las hojas de las plantas expuestas a la radiación UV-B poseen una menor cantidad de células en división, o, alternativamente, a que las células en división tienen un ciclo celular más largo. Para analizar este fenotipo en mayor detalle, se evaluó el tamaño de la DEZ, en donde las células se encuentran en división activa, a través de la tinción de los núcleos con DAPI para encontrar la última figura mitótica. Este ensayo mostró que las hojas de las plantas expuestas a la radiación UV-B tienen una zona de división 35% menor en comparación a la de hojas de plantas control ($P < 0,001$) (Figura 54). A pesar de las diferencias encontradas en el tamaño de esta zona, el tamaño de las células dejando la DEZ no se encontró afectado por la radiación UV-B, mientras que la cantidad de células fue significativamente menor en hojas expuestas a la radiación UV-B (Tabla IV). Por el contrario, la duración del ciclo celular no se modificó por el tratamiento (Tabla IV).

Por lo tanto, la menor producción celular de la hoja #4 de plantas expuestas a la radiación UV-B se debe específicamente al menor número de células en división en la zona de crecimiento; de manera análoga a lo que se describió en Rymen y col. (2007), para estrés por frío. Finalmente, estos resultados mostraron que el tiempo de residencia en la EZ es significativamente mayor en las hojas de plantas expuestas al UV-B; lo que explicaría por qué ambas hojas poseen el mismo tamaño de células maduras (Tabla IV).

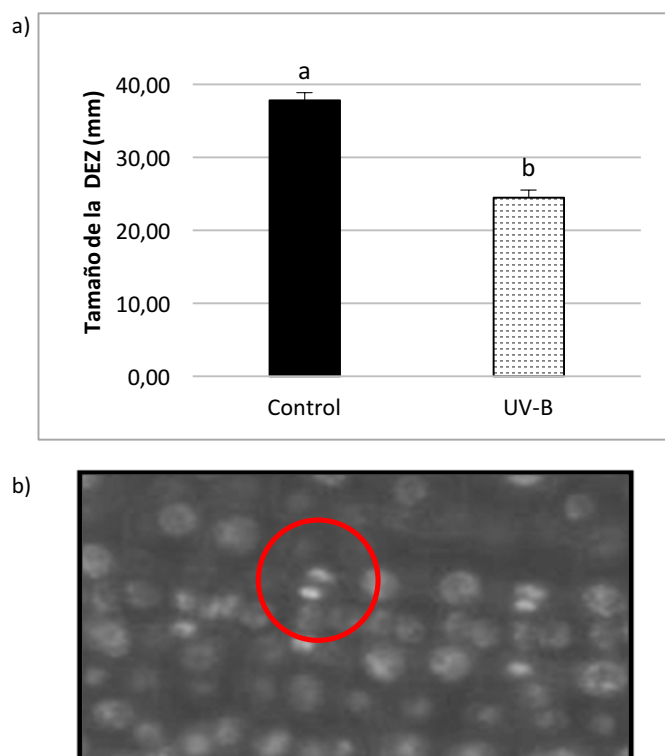


Figura 14: Efecto de la radiación UV-B en el tamaño de la DEZ. A) Tamaño de la DEZ de hojas de plantas en ausencia de UV-B (control) y de hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B (UV-B). Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$. B) Imagen representativa de células epidérmicas teñidas con DAPI que fueron utilizadas para localizar la última figura mitótica para determinar el tamaño de la DEZ.

Parámetros de crecimiento	Control	UV-B	UV-B/C	P
Longitud final de la hoja (cm)	46.1 ± 4.5	40.0 ± 5.7	0,87	0,02
Velocidad de elongación de la hoja (mm/h)	2.21 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0,7	0,009
Tamaño de las células maduras (μm)	120.6 ± 18.0	121.9 ± 7.8	1,01	NS
Producción de células (cel/h)	24.3 ± 4.4	15.4 ± 5.3	0,63	0,01
Tamaño de la DEZ (mm)	37.8 ± 3.9	24.5 ± 2.4	0,65	<0.001
Longitud de la células que dejan la DEZ (μm)	76.0 ± 15.2	66.8 ± 19.5	0,88	NS
Cantidad de células en la DEZ	1614 ± 338	965 ± 196	0,6	0,002
Duración del ciclo celular (h)	46.0 ± 4.9	46.0 ± 11.6	1	NS
Tiempo de residencia en la EZ (h)	16.9 ± 3.6	30.3 ± 8.6	1,79	0,006
Cantidad de células en la EZ	415 ± 137	448 ± 144	1,07	NS
Longitud de la EZ (mm)	43.5 ± 9.3	44.2 ± 9.4	1,01	NS

Tabla IV: Parámetros de crecimiento para la hoja #4 de plantas crecidas en presencia de UV-B (UV-B) y de plantas crecidas en ausencia de UV-B (Control).

En conclusión, la radiación UV-B produce una inhibición del crecimiento de la hoja

#4 que se debe a que la misma posee una DEZ más pequeña, con menor número de células que la hoja #4 de plantas crecidas en ausencia de UV-B.

3.4.3 Efecto de la radiación UV-B en el transcriptoma de la zona de crecimiento (GZ) de maíz

Para analizar molecularmente la inhibición del crecimiento de la hoja #4 de maíz por UV-B, se analizó el transcriptoma de los segmentos I, II y III, que forman parte de la zona de crecimiento de la hoja #4 de maíz cuando la misma se encuentra en la fase de crecimiento estacionario, de plantas crecidas en presencia y en ausencia de UV-B. El transcriptoma de las mismas se analizó por experimentos de ARNseq, en colaboración con el laboratorio del Dr. Beemster en la Universidad de Amberes, Bélgica, para poder identificar transcriptos candidatos a codificar proteínas que participen en esta respuesta (Figura 55). Para cada muestra, se analizaron tres muestras biológicas diferentes.

Para el análisis de los datos, en primer lugar realizamos un agrupamiento jerárquico de cada una de las réplicas biológicas. El mismo mostró que los resultados obtenidos fueron reproducibles entre todas las réplicas biológicas (Figura 55a), a excepción de una de las muestras de hojas expuestas al UV-B correspondiente al segmento III, por lo cual se eliminó para continuar con el análisis. De los 62.892 genes que se encuentran en el genoma de maíz (B73 RefGen_v3; MaizeSequence.org), 46.436 se expresaron en todas las muestras, y el 6% de estos (2801 transcriptos), mostraron expresión diferencial por exposición con UV-B. Para evaluar el efecto global del tratamiento sobre el transcriptoma se realizó un dendograma (Figura 55b), el cual mostró que las réplicas biológicas se agruparon. Además, el árbol mostró que el transcriptoma del segmento I de la hoja de plantas control se asemeja más al transcriptoma del segmento I de la hoja de plantas expuestas al UV-B que al de los segmentos II y III de las plantas control, mostrando que en el segmento I el efecto de desarrollo es mayor que el efecto del tratamiento. Por otro lado, se observó que el transcriptoma del segmento II de la hoja de las plantas control es más parecido al del segmento III de las mismas hojas y no al transcriptoma del segmento II de las hojas de plantas expuestas al UV-B, mostrando que para el segmento II el efecto del tratamiento es mayor que el efecto de desarrollo (Figura 55b). El segmento III de las plantas tratadas con UV-B mostró el transcriptoma más diferente debido a que incluye células que dejaron de dividirse y que solo se expanden (Figura 55b). Es importante destacar que ninguno de los segmentos utilizados para hacer el experimento de ARNseq recibió radiación solar directamente, ya que se encuentran cubiertos por otras hojas maduras en el momento en el que se colectaron las muestras; por lo tanto, la

expresión diferencial debida a la radiación UV-B debe ser transmitida a través de señales por parte de los tejidos expuestos.

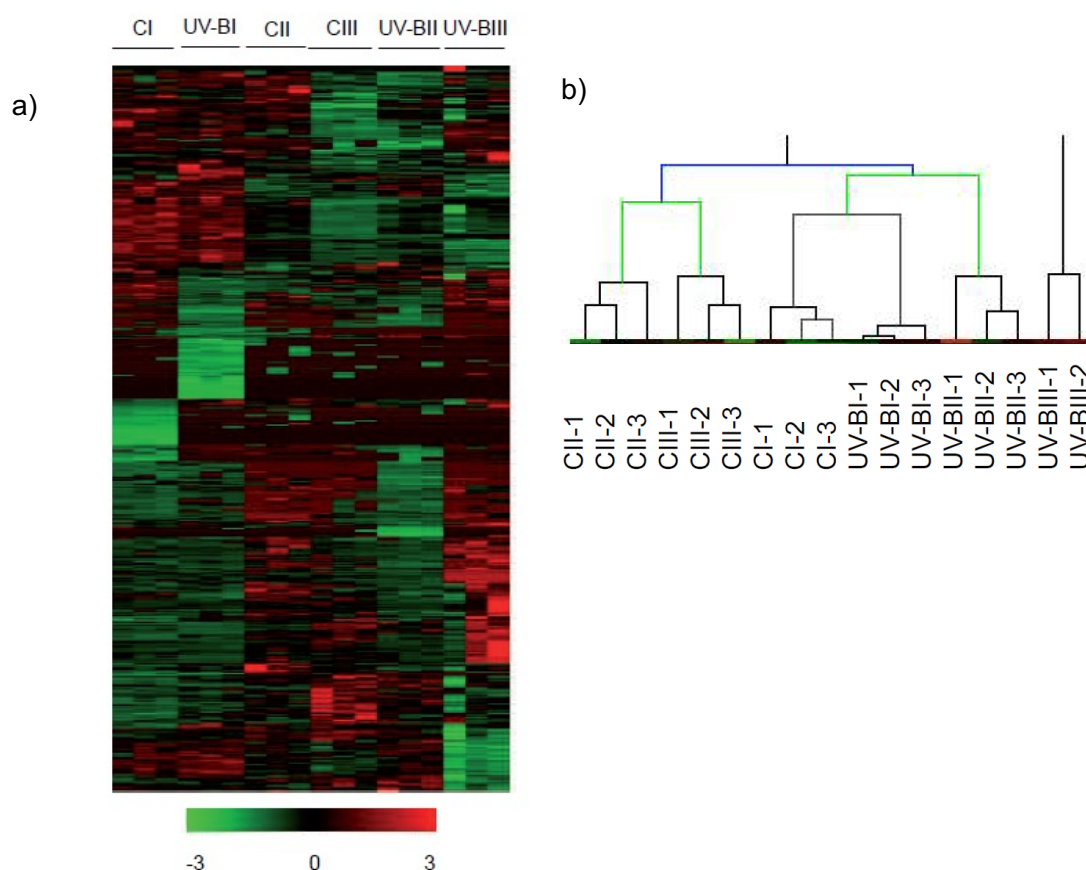


Figura 55: Análisis de las diferencias globales en la expresión génica entre los diferentes segmentos de las hojas de plantas control y expuestas al UV-B correspondientes a la zona de crecimiento. A) Agrupamiento jerárquico de todos los transcritos expresados en los segmentos I, II y III de distintas muestras biológicas de plantas control y expuestas al UV-B. Los valores fueron expresados como el \log_2 de la mediana de los valores de expresión. La escala de color se encuentra debajo de la figura. B) Dendrograma correspondiente a los tres segmentos de cada una de las plantas (control y expuestas al UV-B).

3.4.3.1 Cambios globales en la expresión génica por UV-B

En primer lugar se analizaron los cambios transcripcionales globales causados por la radiación UV-B utilizando el programa Pageman (Figuras 56 y 57). La Figura 56 muestra que algunos transcritos que codifican proteínas de las reacciones luminosas fotosintéticas y de la vía de la fotorespiración están regulados positivamente por la radiación UV-B, mientras que las enzimas implicadas en el metabolismo de la sacarosa y el almidón se encuentran reguladas negativamente por dicha radiación. Como se mencionó anteriormente, los tejidos analizados no están directamente expuestos a la luz en el momento de la recolección, por lo que la actividad fotosintética en estos segmentos es probablemente muy baja. Por otra parte, los transcritos de

diferentes enzimas del metabolismo secundario están mayormente expresados en hojas expuestas a la radiación UV-B, en particular, enzimas del metabolismo de fenilpropanoides, flavonoides y terpenoides. Estos transcritos serían inducidos para proporcionar a las plantas compuestos de protección al UV-B.

Además, la radiación UV-B induce la expresión de enzimas que participan en la degradación y la modificación de la pared celular, mientras que también regula la expresión de enzimas de otras vías metabólicas, tales como enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, del metabolismo de los lípidos, de los aminoácidos y de los nucleótidos (Figura 56).

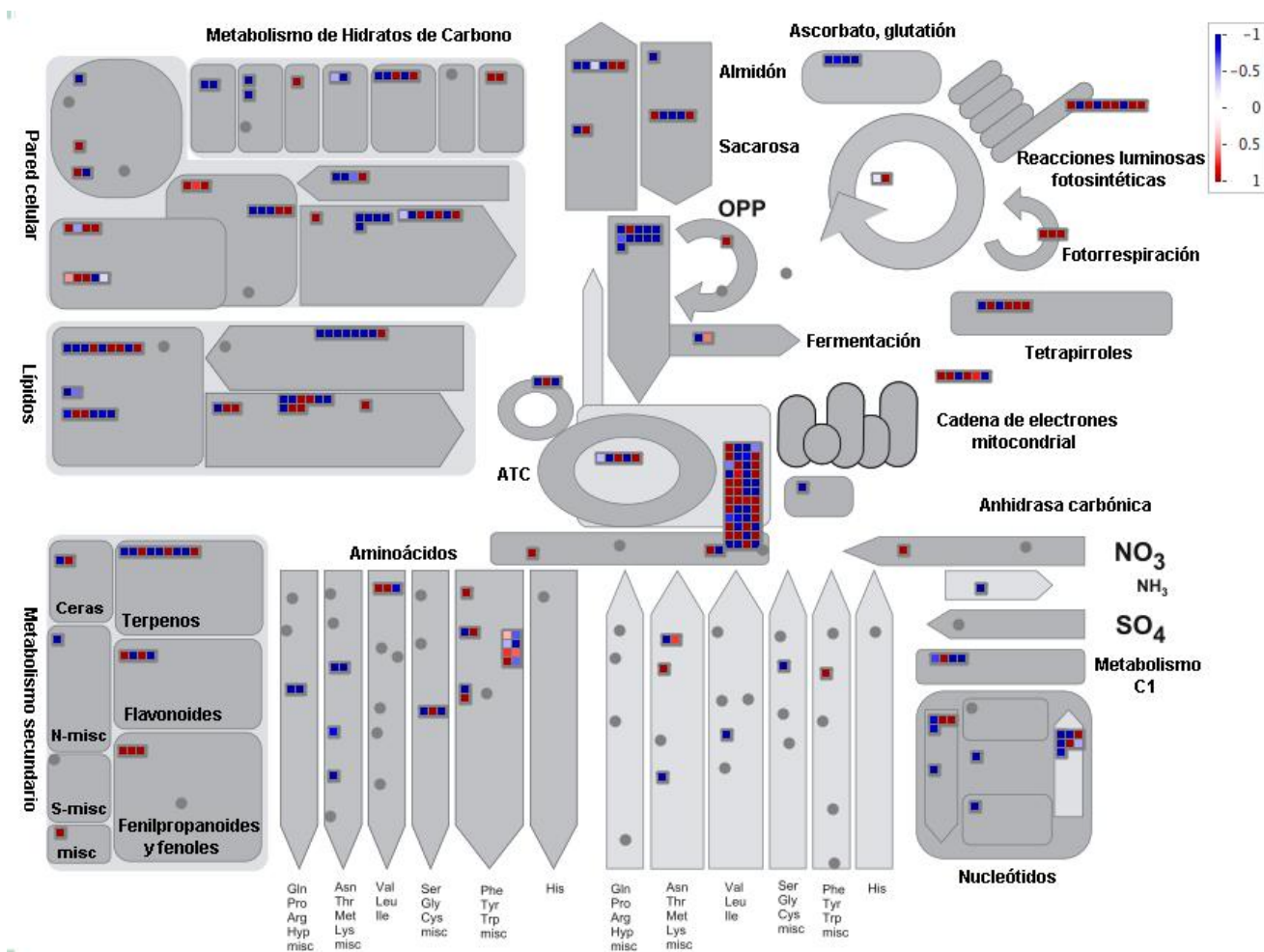


Figura 56: Cambios transcripcionales globales encontrados en la zona de crecimiento de la hoja #4 de maíz causados por la radiación UV-B analizados utilizando Pageman. En esta figura se encuentran representados los transcritos que codifican para proteínas del metabolismo primario y secundario. Los transcritos que se encuentran regulados negativamente por UV-B están representados en color azul y los que se encuentran regulados positivamente por UV-B se ven en color rojo. Referencias: ATC, ácidos tricarboxílicos.

Por otra parte, la Figura 57 muestra que los transcritos de enzimas que participan en las vías de biosíntesis y señalización de las hormonas se encuentran regulados por la radiación UV-B. Por ejemplo, transcritos de enzimas involucradas en

la síntesis, señalización y degradación de ácido abscísico (ABA), de citoquininas, del etileno, y de los ácidos salicílico y jasmonico se encuentran regulados positivamente por la radiación UV-B, mientras que los de proteínas de la vía de las giberelinas y de las auxinas se encuentran reguladas negativamente. Estas proteínas podrían tener un rol en la determinación del menor tamaño de la DEZ de las plantas expuestas a la radiación UV-B. Además, algunos transcritos que codifican factores de transcripción de diferentes familias, como por ejemplo bHLH y bromodominios, enzimas que participan en la degradación proteica y proteínas de señalización como receptores quinasa, fosfoinosítidos y proteínas G están diferencialmente regulados por UV-B,

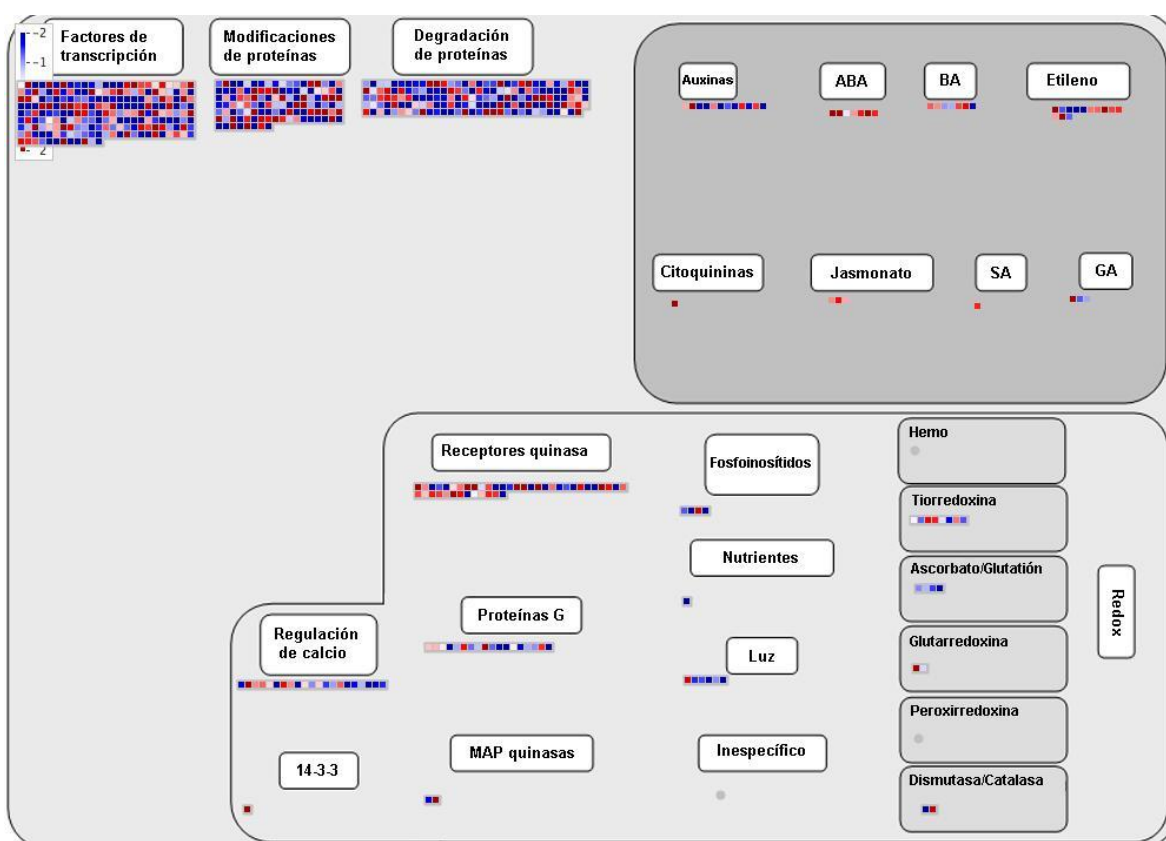


Figura 57: Cambios transcripcionales globales en la zona de crecimiento de la hoja #4 de maíz causados por la radiación UV-B analizados utilizando Pageman. En esta figura se encuentran representados los transcritos que codifican para proteínas que participan en vías regulatorias. Los transcritos que se encuentran regulados negativamente por UV-B están representados en color azul y los que se encuentran regulados positivamente por UV-B se ven en color rojo. Referencias: ABA, ácido abscísico; BA, 6-bencilaminopurina; SA, ácido salicílico; GA, giberelinas; JA, ácido jasmónico.

algunas de estas proteínas podrían cumplir un papel en la inhibición de la proliferación celular por esta radiación.

3.4.3.2 Cambios en los patrones de expresión de los diferentes segmentos de la hoja #4 luego de la exposición al UV-B

Luego, los transcriptos se agruparon en función de los cambios estadísticamente significativos provocados por la radiación UV-B en cada uno de los segmentos analizados, o por la interacción entre el tratamiento y la zona de la hoja de acuerdo a la similitud de los patrones de expresión. Como resultado se obtuvieron 24 grupos (Figura 58, Tabla V).

El grupo con mayor cantidad de transcriptos (grupo I) incluye a aquellos transcriptos cuyos niveles de expresión aumentan con la distancia desde la base de la hoja. En este grupo, a excepción del tercer segmento, en los dos primeros segmentos de plantas expuestas al UV-B los transcriptos muestran menor nivel de expresión que en los respectivos controles. En este grupo se encuentran transcriptos de varias proteínas que participan en las transiciones del ciclo celular y que se requieren durante la división celular (Tabla V). Por ejemplo, en este grupo se encuentran varias ciclofilinas, proteínas del citoesqueleto que participan en la organización de los microtúbulos como la actina y la tubulina, proteínas involucradas en los puntos de control de la mitosis, factores de transcripción involucrados en el desarrollo, tales como proteínas que contienen dominios NAC y *TEOSINTE BRANCHED1*. Por otro lado, a pesar de que el patrón de expresión de los transcriptos en los grupo II y IV es diferente al patrón observado en el grupo I, estos dos grupos también contienen transcriptos cuya expresión en el segmento II es mayor en hojas de plantas control que en el mismo segmento de las de hojas tratadas con UV-B. En el grupo II se incluyen factores de transcripción que regulan las transiciones del ciclo celular como factores de la familia *E2F* (Gutierrez y col., 2002), ciclofilinas, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y algunos factores de transcripción de la familia de los *Growth Regulating factors* o *GRFs*, tales como *GRF1*, *GRF2*, *GRF14* y *GRF15*; mientras que en el grupo IV se encontraron transcriptos para otras ciclofilinas y factores de transcripción similares a *AINTEGUMENTA* y *ASYMMETRIC LEAVES 2* de *Arabidopsis*, los cuales cumplen roles durante el desarrollo y la proliferación celular (Mizukami y Fischer, 2000; Luo y col., 2012). De esta manera, algunos transcriptos que se requieren para la división y proliferación celular son reprimidos por UV-B en la GZ, y la disminución en la expresión de los mismos podría estar relacionada con la disminución del tamaño de la DEZ de las hojas expuestas al UV-B.

Los transcriptos que se encuentran en los grupos V y XIII son interesantes también debido a que poseen un patrón de expresión similar en todos los segmentos tanto en UV-B como control, a excepción del segmento I en el grupo V y el segmento II en el grupo XIII, los cuales muestran una marcada regulación negativa por parte de la

radiación UV-B. Varios factores de transcripción que poseen roles en el desarrollo y la proliferación celular se incluyen en el grupo V, así como un transcripto que codifica para una enzima que actúa en la biosíntesis de auxinas. En el grupo XIII se encontraron transcriptos similares a *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* y *ANGUSTIFOLIA* de *Arabidopsis* (también relacionados con la proliferación celular) (Schruff y col., 2006; Kwak y col., 2015). Nuevamente, la represión de la expresión de estas proteínas por UV-B podría contribuir al fenotipo observado en el análisis cinemático.

Por otro lado, varios transcriptos se encuentran aumentados en los segmentos estudiados de hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B en comparación a los de hojas de plantas control. En la Figura 58 se muestra que estos transcriptos se encuentran en los grupos III, VI, X, XII, XVII y XX. En el grupo III, se encontró el transcripto de la giberelina 2-dioxigenasa, mientras que en el grupo VI y XVII se encontraron transcriptos que codifican proteínas con similitud de secuencia con citoquininas oxidasas de *Arabidopsis*. Tanto la giberelina 2-dioxigenasa (Yamaguchi, 2008) como las citoquininas oxidasas (Schmülling y col., 2003) están involucradas en el catabolismo de las hormonas giberelinas y citoquininas, respectivamente. Por otro lado, varios factores de transcripción se incluyen en el grupo X, tales como algunos factores de transcripción del tipo WRKY y dedos de zinc (Tabla V). Curiosamente, una enzima putativa de reparación al ADN similar a ERCC1 de *Arabidopsis* (Hefner y col., 2003) se encuentra en este grupo, a pesar de que los segmentos de hojas analizados no están directamente expuestos a la radiación UV-B. Por otra parte, en el grupo XII se encuentra el transcripto *TASSEL SEED1*, que codifica para una lipooxigenasa involucrada en la síntesis de jasmonatos en plantas de maíz (Nemchenko y col., 2006) y en el grupo XX un factor de transcripción TCP que podría estar involucrado en la regulación del desarrollo de la hoja (Koyama y col., 2010). Estos u otros factores de transcripción encontrados en estos tres grupos podrían estar involucrados en la represión de los transcriptos de los grupos I, II, IV, V y XIII necesarios para la división celular.

Por último, el grupo XI incluye transcriptos cuya expresión es muy baja en el segmento I de plantas control y alta en el mismo segmento de plantas irradiadas, mientras que el grupo XXIII incluye transcriptos cuya expresión es baja en los segmentos II y III de plantas control y alta en dichos segmentos de plantas expuestas a la radiación UV-B (Figura 58). En el grupo XXIII se encontró otro factor de transcripción del tipo TCP con un rol putativo en el desarrollo de las plantas (Tabla V). Este factor de transcripción podría tener un rol en la regulación de la expresión de proteínas necesarias para la salida del ciclo celular, induciendo una diferenciación más temprana bajo condiciones de UV-B.

A modo de conclusión, los datos de expresión obtenidos sugieren que el menor número de células en la zona de crecimiento de las plantas expuestas a la radiación UV-B podría estar asociado con cambios transcripcionales de reguladores positivos y negativos del ciclo celular y el desarrollo.

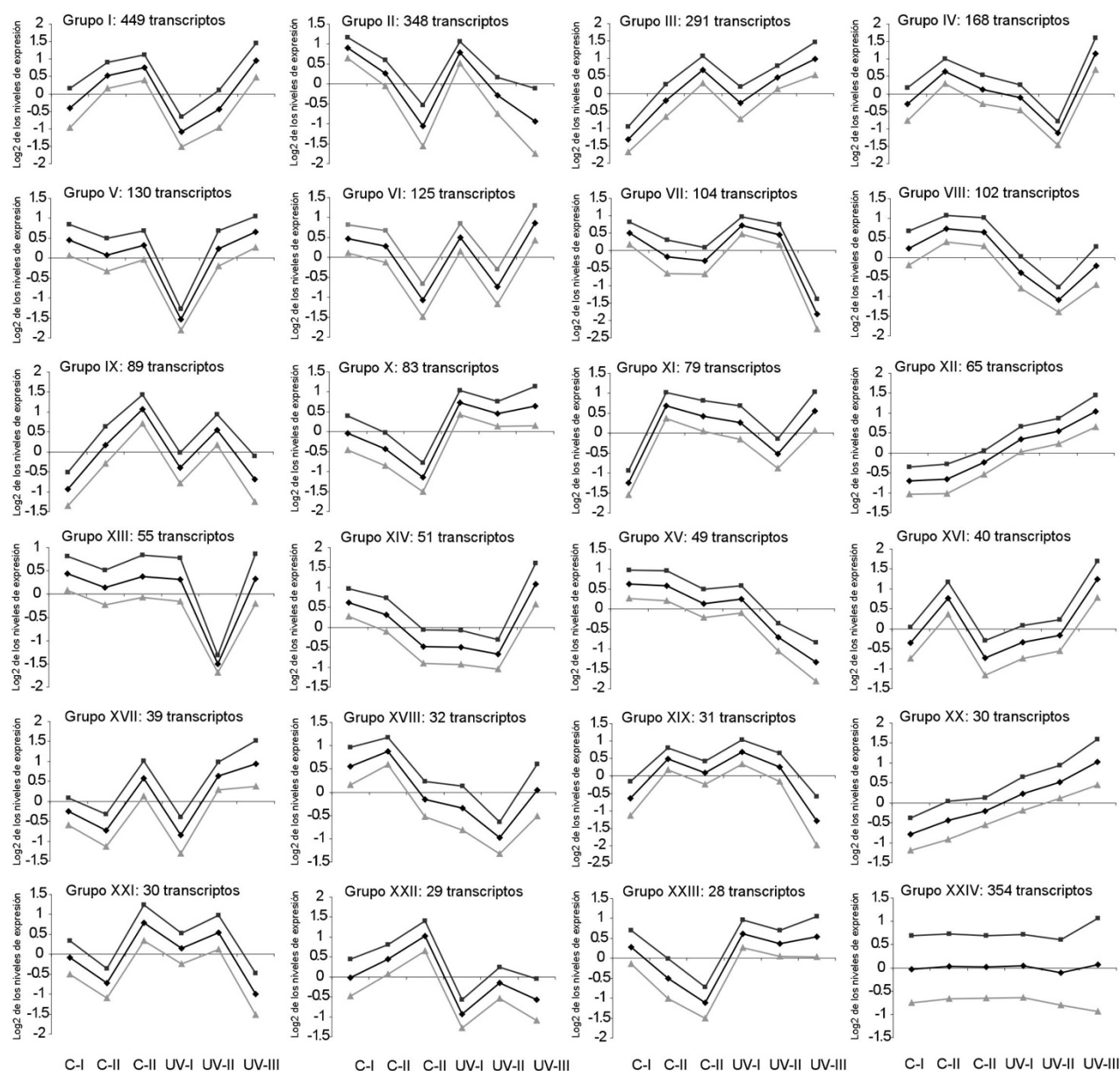


Figura 58: Análisis de los perfiles de expresión de los genes regulados por UV-B a lo largo de los segmentos correspondientes a la zona de crecimiento de hojas de maíz expuestas al UV-B (UV) y de hojas control (C). Los transcritos con perfil de expresión similar se agruparon y en cada gráfico se muestra la expresión promedio de las tres réplicas biológicas en líneas negras y el desvío estándar en líneas grises. Los valores graficados corresponden al \log_2 de los niveles de expresión génica. El número de transcritos de cada grupo se encuentra en la parte superior de cada gráfico.

Tabla V: Transcritos diferencialmente expresados en condiciones Control y UV-B. En la tabla se muestra el grupo en el que se encuentra el transcritpo, el ID del transcritpo, el nombre del gen y la categoría funcional a la cual pertenece. Además se detalla si la expresión diferencial se debe al tratamiento o a la interacción entre el tratamiento y la zona de la hoja, utilizando un cero para cuando no hay expresión diferencial y un uno cuando hay diferencias en la expresión. Por último, se detalla el valor de expresión obtenido para cada caso, en donde C-I, C-II y C-III, son los segmentos 1, 2 y 3 en condiciones control y UV-B-I, UV-B-II y UV-B-III son los segmentos 1, 2 y 3 en condiciones de UV-B, respectivamente.

Grupo	ID del transcritpo	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
I	GRMZM2G070807_T05	cyclophilin-type family protein	ciclo celular	0	1	-0,42	0,87	0,57	-0,65	-1,13	1,15
I	GRMZM2G049525_T02	CYCLOPHILIN71	organización celular	0	1	-0,68	0,54	0,73	-0,6	-0,92	1,38
I	GRMZM2G126190_T03	actin 7	organización celular	0	1	0,05	0,58	0,45	-0,99	-0,95	1,3
I	GRMZM2G071790_T05	BETA-6 TUBULIN	organización celular	0	1	-0,45	0,58	0,47	-0,87	-0,83	1,64
I	GRMZM2G068755_T02	MICROTUBULE ORGANIZATION 1-like	organización celular	1	1	0,21	0,58	0,62	-0,86	-1,23	1,04
I	GRMZM2G062084_T02	phragmoplast-associated kinesin-related protein 2	organización celular	0	1	-0,53	0,34	0,1	-0,66	-0,68	2,16
I	GRMZM2G034362_T02	MYOSIN-like	organización celular	0	1	-0,35	-0,03	1,19	-0,25	-1,35	1,19
I	GRMZM2G048826_T01	transcription factor of the NAC family	desarrollo	1	0	-0,15	1,02	0,59	-1,42	-0,24	0,29
I	GRMZM2G090217_T01	MSI type nucleosome/chromatin assembly factor C	desarrollo	1	1	0,58	0,56	0,56	-1,05	-1,28	0,94
I	GRMZM2G406204_T01	transcription factor of the NAC family	desarrollo	1	0	0,24	0,22	0,71	-0,73	-1,1	1,01
I	GRMZM2G332838_T04	histone H4	síntesis de ADN/estructura de la cromatina	1	0	-0,62	0,4	0,94	-1,44	0,36	0,55
I	GRMZM2G009913_T04	spindle checkpoint protein-related	no asignado	1	0	0,65	0,2	0,65	-1,5	-0,42	0,65
I	GRMZM2G166687_T01	teosinte branched1 protein	regulación de la transcripción	1	0	0,33	0,77	0,41	-1,39	-0,63	0,77

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
II	GRMZM2G006107_T02	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family protein	ciclo celular	0	1	1,05	0,33	-1,72	0,75	-0,35	-0,09
II	GRMZM2G157510_T01	cyclin dependent kinase inhibitor	ciclo celular	0	1	0,97	-0,31	-0,62	1,36	-0,39	-1,53
II	GRMZM2G135770_T02	regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	división celular	1	0	1,15	0,5	-0,83	0,81	-0,87	-1,15
II	GRMZM2G149994_T03	CDC48B-like	división celular	0	1	0,39	0,45	-0,89	1,4	-0,55	-1,2
II	GRMZM2G025340_T02	HYPERSENSITIVE TO MMS, IRRADIATION AND MMC like protein	división celular	1	0	0,87	0,94	-0,75	0,37	-0,7	-1,08
II	GRMZM2G149994_T04	CDC48B- like protein	división celular	0	1	0,64	0,64	-0,19	0,85	-0,8	-1,72
II	GRMZM2G106028_T01	microtubule-associated protein- like	organización celular	0	1	0,99	0,31	-1,56	0,91	0,12	-1,15
II	GRMZM2G057000_T05	brassinosteroid biosynthesis-like protein	metabolismo de las hormonas	0	1	1,15	0,37	-0,83	0,54	-1,15	-0,1
II	GRMZM2G378580_T06	AUXIN RESPONSE FACTOR 2 like protein	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,6	0,53	-0,78	1,13	-0,36	-1,67
II	GRMZM2G087161_T01	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	ARN.regulación de la transcripción	0	1	1,19	0,03	-1,56	0,95	-0,22	-0,6
II	GRMZM2G050590_T01	E2F-related protein	ARN.regulación de la transcripción	0	1	1,07	0,11	-1,47	1,06	-0,34	-0,64
II	GRMZM2G060000_T01	E2F-like 1 transcription factor	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,85	0,46	-0,98	0,74	0,27	-1,99
II	GRMZM2G040131_T01	methyl-binding domain protein MBD101	regulación de la transcripción	0	1	0,89	0,19	-0,33	0,87	-0,25	-2,04
II	GRMZM2G176910_T01	growth inhibition and differentiation-related protein 88	ciclo de los ácidos tricarboxílicos	0	1	0,89	0,02	-0,32	0,82	-0,01	-2,1
II	GRMZM2G034876_T01	growth-regulating factor 1 (GRF1)	ARN.regulación de la transcripción	1	1	2,52	2,23	0,35	2,69	1,69	-0,01
II	GRMZM2G178261_T01	growth-regulating factor 15 (GRF15)	ARN.regulación de la transcripción	1	1	2,60	1,90	-0,46	2,83	1,34	-0,39
II	GRMZM2G099862_T01	growth-regulating factor 2 (GRF2)	ARN.regulación de la transcripción	1	1	2,87	1,56	-0,21	2,89	1,24	-0,59
II	GRMZM5G853392_T02	growth-regulating factor 14 (GRF14)	ARN.regulación de la transcripción	1	1	2,14	2,33	0,77	2,31	2,07	0,59

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
III	GRMZM2G051619_T01	gibberellin 2-beta-dioxygenase	metabolismo de las hormonas	1	0	-1,75	0,14	0,45	-0,26	0,80	0,95

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
IV	GRMZM2G367206_T06	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin-type family protein	ciclo celular	0	1	0,53	0,68	-0,55	0,23	-1,38	0,74
IV	GRMZM2G057000_T03	brassinosteroid biosynthesis-like protein	metabolismo de las hormonas	0	1	0,17	-0,11	0,05	-0,66	-0,81	2,04
IV	GRMZM2G132774_T01	cyclin like protein	proteínas.modificaciones postraduccionales	0	1	-0,42	0,11	0,64	-0,43	-1,08	1,76
IV	GRMZM2G021573_T02	similar to AINTEGUMENTA TF	ARN.regulación de la transcripción	0	1	-0,35	-0,09	1,19	-0,14	-1,4	1,19
IV	GRMZM2G133806_T02	similar to ASYMMETRIC LEAVES 2 TF	ARN.regulación de la transcripción	0	1	-0,57	1,01	-0,21	-0,69	-0,54	1,49

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
V	GRMZM2G387227_T01	CYCA1;1-like	ciclo celular	0	1	0,58	-0,01	0,21	-1,76	0,58	0,58
V	GRMZM2G447151_1	SAUR14 - auxin-responsive SAUR family member	metabolismo de las hormonas	0	1	0,58	0,58	-0,08	-1,48	0,58	0,58

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
VI	GRMZM2G050997_T01	similar to cytokinin oxidase 2	metabolismo de las hormonas	0	1	0,54	-0,53	-1,15	0,62	-0,50	1,54

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
X	GRMZM2G123896_T04	dormancy/auxin associated family protein	desarrollo	1	0	-1,23	-0,31	-0,7	0,6	0,86	1,17
X	GRMZM2G073510_T03	ERCC1 (UV REPAIR DEFICIENT 7) like protein	ARN.regulación de la transcripción	1	0	-0,62	-0,44	-0,76	0,52	0,53	1,15
X	GRMZM2G034260_T03	similar to RNA polymerase II mediator complex protein-related	RNA.transcripción	1	0	-0,57	-0,15	-0,92	0,37	0,71	0,85
Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XI	GRMZM2G009892_T04	transcription factor of the NAC family	desarrollo	0	1	-1,46	0,62	0,62	0,62	-0,83	0,62
Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XII	GRMZM2G104843_T01	tassel seed1	metabolismo de las hormonas	1	0	-0,36	-1,1	0,11	0,04	0,46	1,27
XII	GRMZM2G118250_T05	similar to ASYMMETRIC LEAVES 2 TF	ARN.regulación de la transcripción	1	0	-0,15	-1,31	-0,12	-0,06	0,68	1,45
Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XIII	GRMZM2G378580_T07	similar to AUXIN RESPONSE FACTOR 2	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,63	0,27	0,04	0,86	-1,82	0,04
XIII	GRMZM2G476107_T02	similar to ANGUSTIFOLIA	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,31	0,73	0,16	0,82	-1,56	-0,69
XIII	GRMZM2G118205_T01	Polycomb group protein FIE1 (Protein FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM 1)	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,53	0,53	-0,25	0,53	-1,68	0,53
XIII	GRMZM2G419409_T01	SUVH5 (SU(VAR)3-9 HOMOLOG 5)	ARN.regulación de la transcripción	1	0	0,71	-0,5	0,88	0,55	-1,69	0,09

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XVII	GRMZM5G817173_T03	similar to cytokinin oxidase 5	metabolismo de las hormonas	1	0	-2,29	-0,82	-1,23	-1,66	0,32	-1,51

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XX	GRMZM2G166946_T03	similar to TCP5 (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA AND PCF TRANSCRIPTION FACTOR 5)	ARN.regulación de la transcripción	1	0	-1,25	0,16	-0,21	-0,11	0,81	0,92

Grupo	ID del transcripto	Gen	Categoría funcional	Expresión diferencial debida al tratamiento	Expresión diferencial debida a la interacción	C-I	C-II	C-III	UV-B-I	UV-B-II	UV-B-III
XXIII	GRMZM2G129247_T03	bZIP transcription factor family protein	ARN.regulación de la transcripción	0	1	0,87	-0,66	-1,09	0,02	1,28	-0,62
XXIII	GRMZM2G092214_T02	similar to TCP20 TF	ARN.regulación de la transcripción	1	0	-0,01	-1,11	-0,36	0,65	0,4	0,65

3.4.4 Cuantificación de los niveles de fitohormonas en la la hoja #4 de maíz de plantas control y expuestas al UV-B

Los resultados de los experimentos de transcriptómica demostraron que transcriptos de enzimas que participan en las vías de biosíntesis, señalización y degradación de algunas hormonas se encuentran regulados por la radiación UV-B (Figura 57, Tabla V). Diferentes estudios sugieren que las fitohormonas juegan un papel importante en la regulación de distintos procesos de desarrollo y de las vías de señalización que participan en el crecimiento de las plantas (Wilkinson y Davies, 2010; Jaillais y Chory, 2011; Nelissen y col., 2012; Colebrook y col., 2014; Oracz y Karpiński, 2016). En particular, Nelissen y col. (2012) demostraron que la concentración de auxinas y citoquininas son altas en tejidos en activa división, mientras que las giberelinas muestran un pico en la transición entre la zona de expansión y división celular en hojas de maíz. Por ello, a continuación se determinaron los niveles de distintas hormonas vegetales a lo largo de la hoja de plantas de maíz expuestas al UV-B y se compararon con los de hojas de plantas control. En particular, la concentración de auxinas, citoquininas, giberelinas, y de los ácidos abscísico, jasmónico y salicílico se midió utilizando cromatografía líquida o alternativamente gaseosa acoplada a espectrometría de masas como se describe en Materiales y Métodos, en los primeros 10 segmentos de la hoja #4 de plantas expuestas y no expuestas a la radiación UV-B.

Las Figuras 59 y 60 muestran que las concentraciones de auxinas, giberelinas y citoquininas aromáticas e isoprenoides, variaron significativamente a lo largo de la hoja; sin embargo sólo algunas de ellas mostraron diferencias significativas por UV-B en ciertos segmentos foliares. Por ejemplo, los niveles de IAA fueron menores en los segmentos de hojas II-VI de las plantas expuestas a la radiación UV-B, mientras que la concentración de la citoquinina aromática pT9G fue significativamente mayor en todos los segmentos foliares en plantas irradiadas y los niveles de la citoquinina isoprenoide ZN-7-G aumentaron por UV-B en los segmentos VIII y IX. Por otra parte, desafortunadamente no se pudo detectar ninguna de las giberelinas bioactivas (GA1 y GA4), las cuales presentan un pico en la transición entre la DEZ y EZ (Nelissen y col., 2012); sin embargo, si se pudo medir la giberelina 19 (GA19), la cual es un intermediario de la síntesis de GA1. GA19 muestra, en condiciones control, un patrón de concentración similar a lo largo de las hojas de maíz a GA1, alcanzando su punto máximo en la transición entre la DEZ y la EZ (Nelissen y col., 2012). Por el contrario, las hojas irradiadas con UV-B mostraron concentraciones significativamente menores de GA19 en los segmentos II, III y IV, que corresponden a la GZ. De esta manera, las variaciones en los niveles de GA19

por UV-B se correlacionan con los cambios observados en el tamaño de la GZ causados por esta radiación. Estos resultados se correlacionan también con los datos obtenidos por los análisis de transcriptómica, donde se observó que transcritos que codifican para enzimas involucradas en el catabolismo de giberelinas se encuentran aumentados por esta radiación (Tabla V).

Por otro lado, se midieron los niveles de los ácidos abscísico (ABA), jasmónico y salicílico (Figura 61). Los niveles de ABA y de ácido salicílico no difirieron significativamente entre las muestras de hojas control y expuestas al UV-B. Estos resultados no se correlacionan con los resultados obtenidos con los perfiles transcripcionales, donde los transcritos para enzimas de la vía de estas hormonas aumentaron por UV-B. Por el contrario, la concentración de ácido jasmónico aumentó por UV-B en la mayoría de los segmentos analizados, en concordancia con los resultados del análisis de transcriptómica, donde se observó que algunos transcritos para enzimas de la vía regulada por esta hormona se indujeron por esta radiación (Tabla V).

Los resultados obtenidos demuestran que, de acuerdo con algunos cambios en el perfil transcripcional, los niveles de algunas hormonas se encuentran modificados en las hojas de plantas expuestas al UV-B, y estos cambios podrían tener un rol en la inhibición de la elongación de las hojas en respuesta a esta radiación. En particular, la giberelina GA19 mostró concentraciones significativamente menores en los segmentos correspondientes a la GZ de hojas expuestas al UV-B. Por ello, es posible que la disminución del tamaño de la DEZ de las hojas de plantas de maíz expuestas al UV-B sea el resultado de modificaciones en los niveles de las giberelinas por esta radiación.

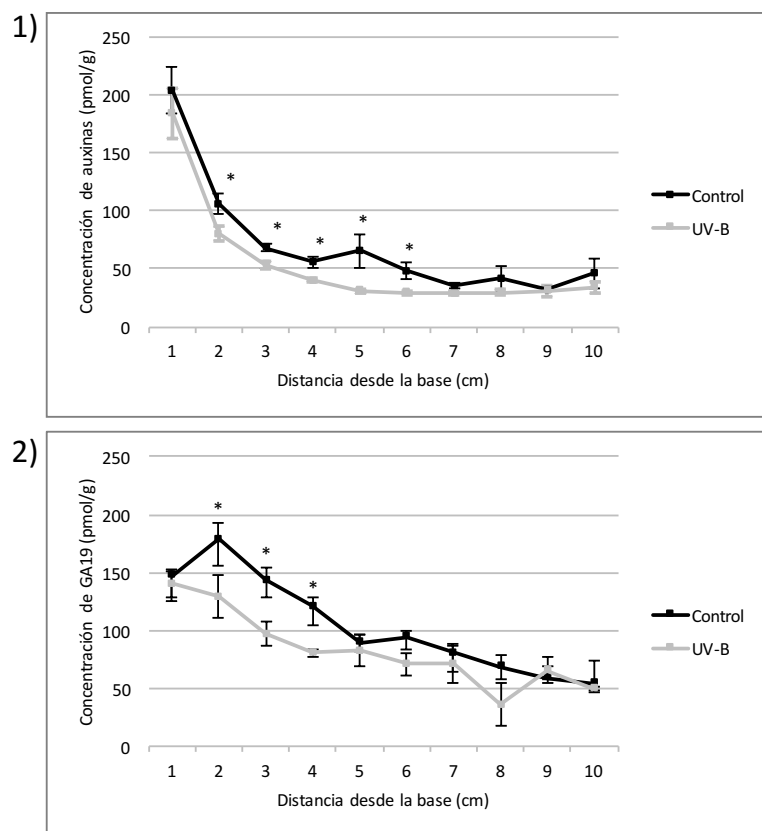


Figura 59: Concentración endógena de 1) auxinas (ácido indolacético, [IAA]) y 2) giberelinas [GA19]. Se grafican los promedios de 6 réplicas biológicas con los errores estándares y los asteriscos muestran diferencias significativas entre plantas expuestas a la radiación UV-B respecto a plantas control, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

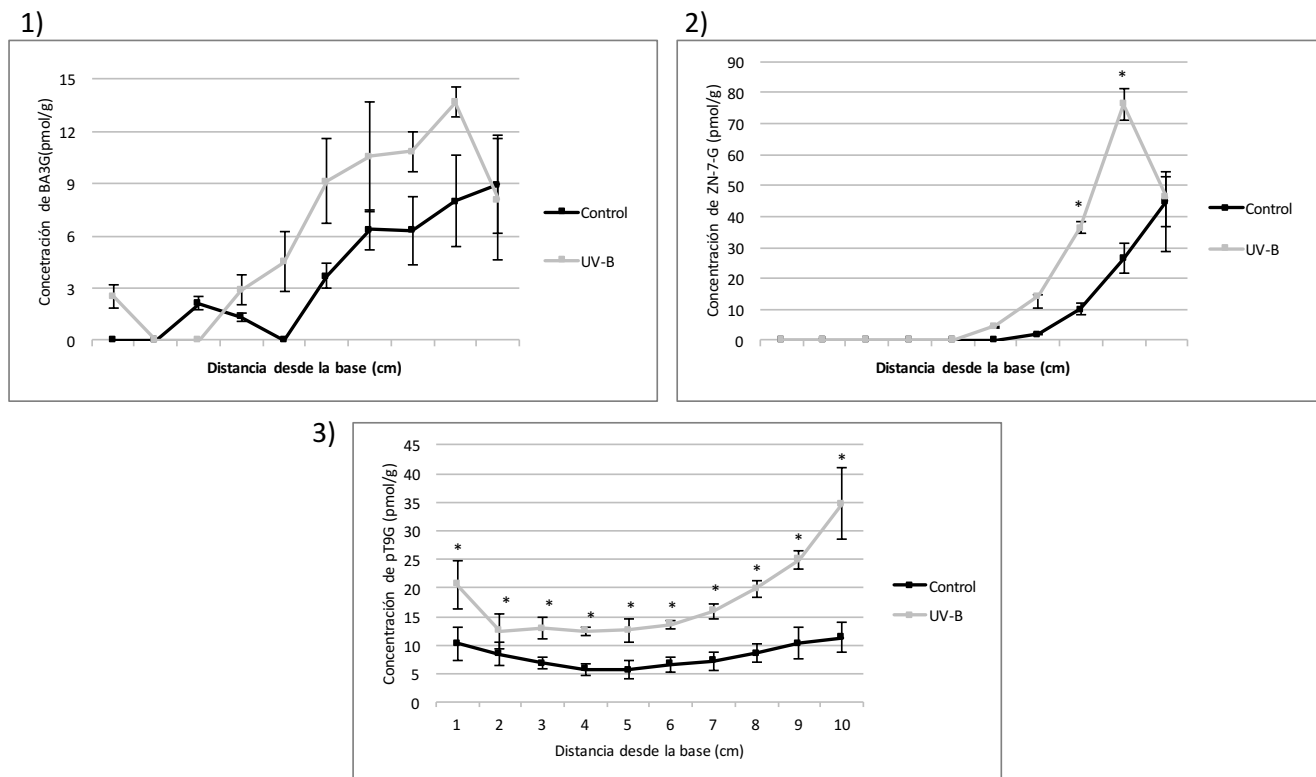


Figura 60: Concentración endógena de citoquininas: 1) 9-glucosido de benciladenina [BA9G], 2) 7-glucósido de trans-Zeatina [ZN-7-G] y 3) para-topolin-9-glucósido, [pT9G]. Se grafican los promedios de 3 réplicas biológicas con los errores estándares y los asteriscos muestran diferencias significativas entre plantas expuestas a la radiación UV-B y plantas control, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

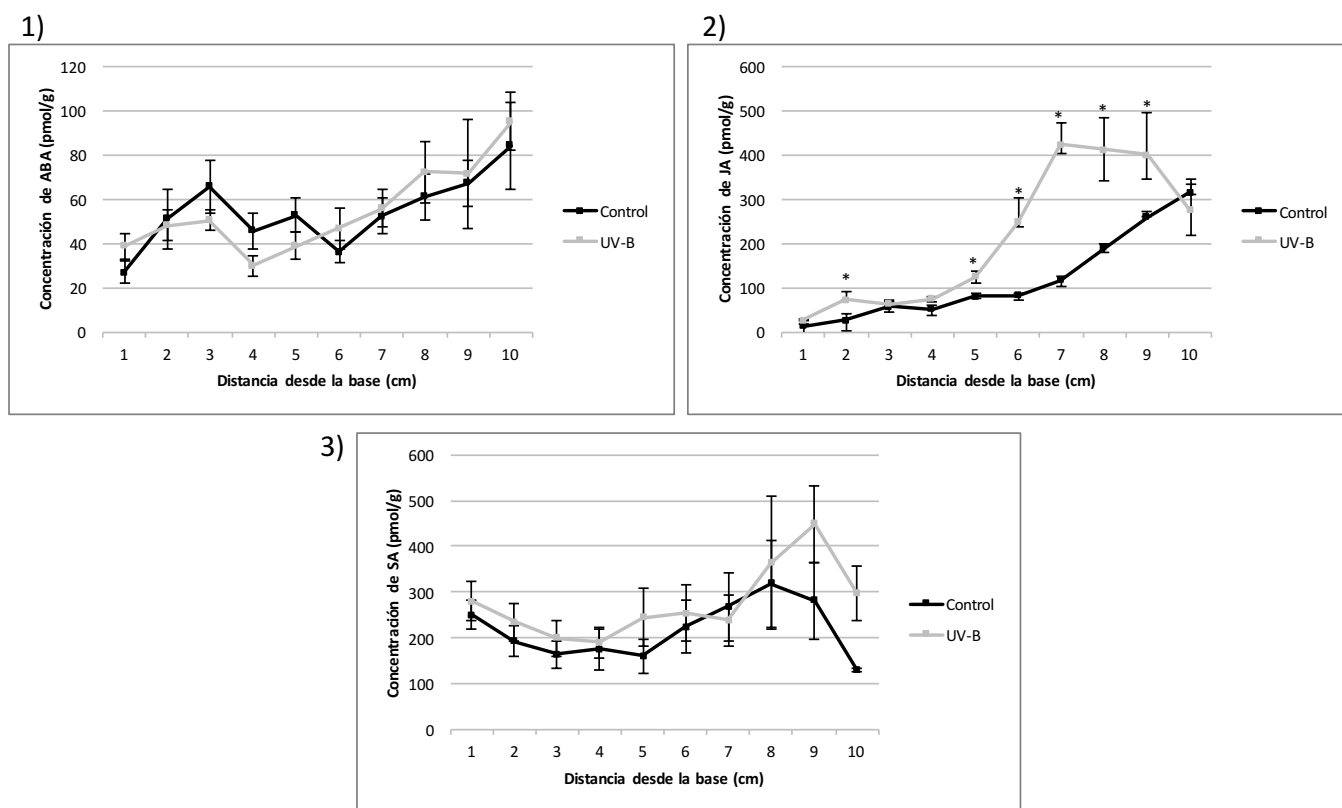


Figura 61: Concentración endógena de 1) ácido abscísico [ABA], 2) ácido jasmónico [JA] y 3) ácido salicílico [SA]. Se grafican los promedios de 6 réplicas biológicas con los errores estándares y los asteriscos muestran diferencias significativas entre plantas expuestas a la radiación UV-B y plantas control, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

En particular, se ha reportado que algunas hormonas se encuentran reguladas por algunos factores de transcripción de la familia GRF (Vercruyssen y col., 2011; Hewezi y Baum, 2012; Liu y col., 2014). Por otro lado, el microARN396 (miR396), el cual es un regulador negativo de los factores de transcripción GRFs, también se encuentra involucrado en la regulación de genes involucrados en las vías de síntesis y señalización de algunas fitohormonas (Curaba y col., 2014). Por lo tanto, debido a que los experimentos de ARNseq mostraron expresión diferencial de algunos GRFs (Tabla V, grupo II), entre ellos el *ZmGRF1*, nos propusimos analizar si el factor de transcripción GRF1 podría estar involucrado directamente en la respuesta de inhibición de crecimiento de la hoja a la radiación UV-B.

3.4.5 Rol del factor de transcripción ZmGRF1 en la inhibición del crecimiento por la radiación UV-B

Como se describe en el párrafo anterior, en otras especies los GRFs regulan los niveles de algunas hormonas involucradas en el crecimiento vegetal. Además, previamente en nuestro laboratorio se demostró que la radiación UV-B produce una inhibición del crecimiento de las hojas de plantas de *Arabidopsis*, y dependiendo del

estadio en el que las hojas son irradiadas, el UV-B produce inhibición de la proliferación y/o de la expansión celular, generando finalmente plantas con hojas más pequeñas. También se demostró que la inhibición de la proliferación celular inducida por la radiación UV-B está regulada por el miR396 (cuya expresión se encuentra aumentada bajo condiciones de UV-B) y los GRF1, 2 y 3, los cuales son importantes reguladores del crecimiento de las hojas (Casadevall y col., 2013). Por otro lado, Nelissen y col. (2015) demostraron que plantas de maíz que sobreexpresan el factor de transcripción GRF1 insensible al miR396 (denominadas GRF1^R) poseen hojas más largas que las de plantas salvajes, y a través de un análisis cinemático determinaron que las plantas GRF1^R poseen un mayor tamaño de la DEZ debido a que el mismo posee una mayor cantidad de células.

Por ello, el siguiente objetivo fue analizar si el factor de transcripción GRF1 podría estar involucrado directamente en la respuesta de inhibición del crecimiento de las hojas de maíz por UV-B. En primer lugar se analizó el patrón de expresión del miR396 a lo largo de la hoja #4 de plantas expuestas a la radiación UV-B y de plantas control, y luego se realizó un análisis cinemático comparativo del crecimiento de la hoja #4 utilizando plantas GRF1^R y plantas salvajes del mismo genotipo crecidas en condiciones control y expuestas al UV-B.

3.4.5.1 Expresión del miR396 luego de la exposición al UV-B

Para llevar a cabo este objetivo, se sembraron plantas de maíz expuestas y no expuestas a la radiación UV-B y se extrajo ARN de los 3 primeros segmentos de la hoja #4 para medir por RT-PCR en tiempo real la expresión del miR396. Los niveles del miR396 se determinaron relativos a la expresión de un transcrito *TIORREDOXINA-LIKE*, el cual no varía por UV-B ni a lo largo de la hoja. La Figura 62 muestra que el miR396 se induce en hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B en los segmentos II y III. A su vez puede observarse que la expresión del miR396 es muy baja en el primer segmento, y la misma aumenta progresivamente en los segmentos II y III, tanto de hojas expuestas al UV-B como de hojas de plantas control.

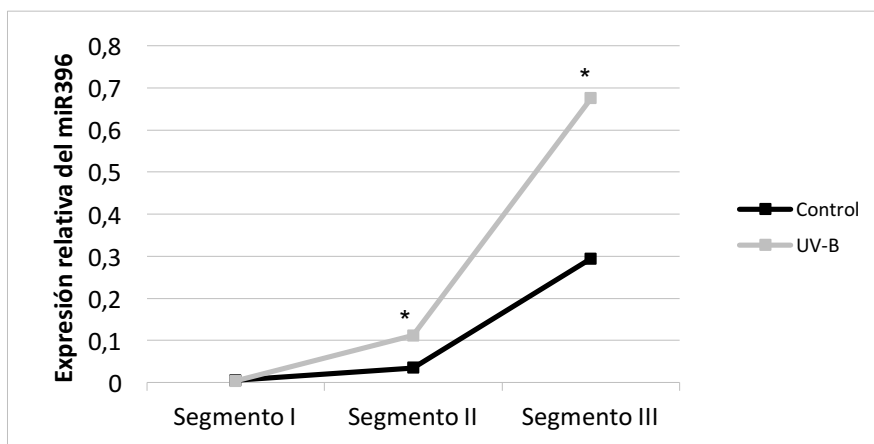


Figura 62: Expresión del miR396 relativa a la expresión de tiorredoxina en distintos segmentos de la hojas #4 de maíz. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas biológicas y los asteriscos muestran diferencias significativas entre hojas de plantas control y de plantas expuestas al UV-B, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

3.4.5.2 Análisis cinemático de plantas *GRF1^R*

Posteriormente, se realizó un análisis cinemático comparativo de la hoja #4 de plantas *GRF1^R* y salvajes expuestas al UV-B y crecidas en condiciones control. En estos experimentos, los tratamientos con UV-B fueron realizados en invernadero en condiciones de temperatura y humedad controladas, utilizando lámparas que emiten radiación UV-B a una intensidad de $0,7 \text{ W.m}^{-2}$ durante 8 h diarias. La Tabla VI y la Figura 63 muestran que estas condiciones experimentales generaron resultados similares a los obtenidos utilizando la luz solar como fuente de UV-B en cuanto al efecto de inhibición del crecimiento de las hojas salvajes de maíz por radiación UV-B. En primer lugar, se midió el largo final de la hoja #4 de plantas salvajes y de plantas *GRF1^R* control y tratadas con radiación UV-B. La Figura 63 muestra que el tamaño final de la hoja #4 tanto de las plantas salvajes como de las plantas *GRF1^R* fue menor en plantas expuestas a la radiación UV-B; sin embargo, las plantas *GRF1^R* presentaron una menor inhibición del crecimiento por UV-B que las plantas salvajes.

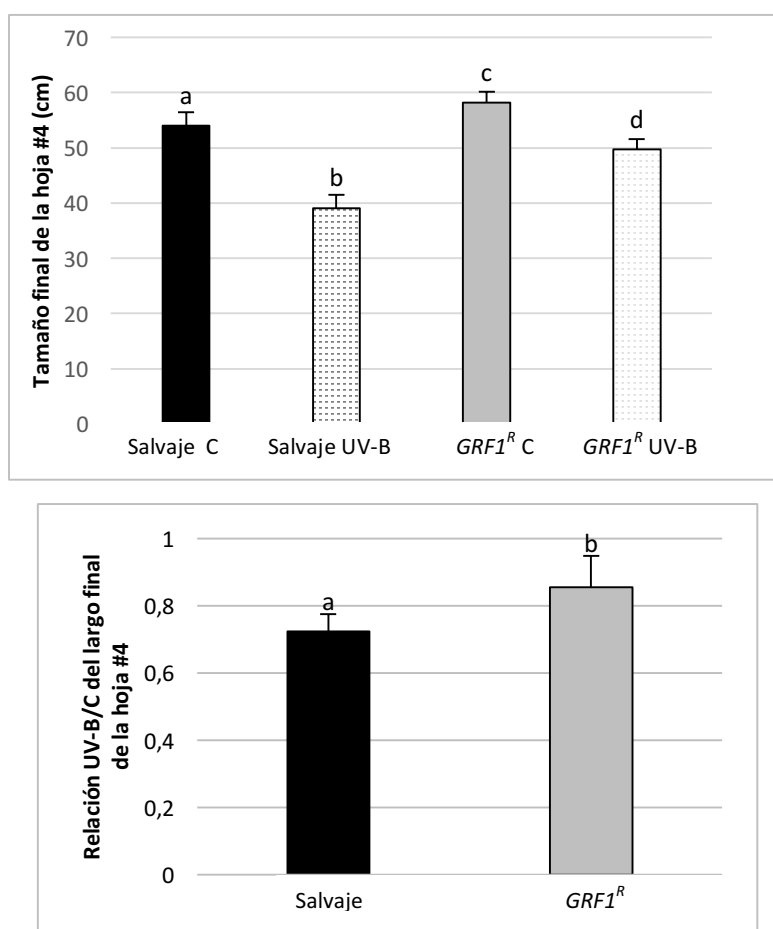


Figura 63: Efecto de la radiación UV-B en el crecimiento de la hoja #4 de plantas salvajes y GRF1^R. A) Longitud de la hoja #4 de plantas crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B y en presencia de UV-B de plantas salvajes y de plantas GRF1^R. B) Relación UV-B/control del largo final de la hoja #4 de plantas GRF1^R y salvajes. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

Luego se determinó la velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas salvajes y GRF1^R crecidas en ambas condiciones. Las hojas #4 de plantas GRF1^R mostraron una menor inhibición de la velocidad de elongación por UV-B que las de las plantas salvajes (Figura 64).

Finalmente se estableció el perfil celular a lo largo de la hoja de plantas salvajes y GRF1^R en condiciones control y luego del tratamiento con UV-B y se calcularon los parámetros cinemáticos del crecimiento, lo cual se realizó utilizando el mismo procedimiento anteriormente descrito para las plantas B73. Los resultados se encuentran en la Tabla VI, donde se presenta la relación UV-B/C de cada uno de los parámetros de crecimiento tanto para la hoja #4 de las plantas salvajes como de las plantas GRF1^R. El tamaño de las células maduras provenientes de hojas expuestas al UV-B relativo al de hojas de plantas control fue similar en plantas salvajes y GRF1^R (Tabla VI). Por otra parte, luego del tratamiento con radiación UV-

B, las hojas de plantas *GRF1^R* mostraron una menor disminución del tamaño de la DEZ que las hojas de plantas salvajes, y esto se debe a que presentaron una menor inhibición de la velocidad de producción de células en la zona de crecimiento (Tabla VI). Como se expuso previamente, la inhibición de la velocidad de producción celular puede deberse a que en la GZ exista una menor cantidad de células en división activa, o a que el ciclo celular sea más lento. Los resultados obtenidos mostraron que la menor inhibición de la velocidad de producción celular de las plantas *GRF1^R* luego del tratamiento con UV-B se debe a que existe una menor disminución en la cantidad de células en división activa, dado que no existen diferencias significativas en la duración del ciclo celular en hojas expuesta al UV-B de plantas salvajes y *GRF1^R*. Por último, se observó una diferencia significativa en la longitud de la EZ que puede deberse al tiempo de residencia de las células, dado que las células de las hojas *GRF1^R* en condiciones de UV-B permanecen mayor tiempo en dicha zona que las células de hojas de plantas salvajes (Tabla VI).

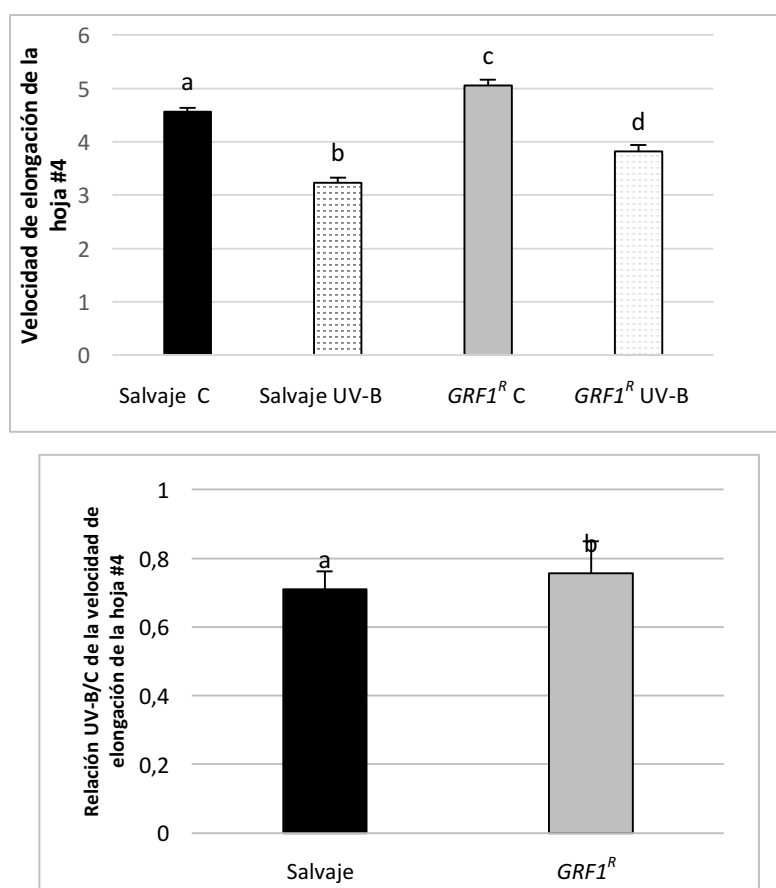


Figura 64: Efecto de la radiación UV-B en la velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas salvajes y *GRF1^R*. A) Velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas crecidas en condiciones control en ausencia de UV-B y en presencia de UV-B de plantas salvajes y plantas *GRF1^R*. B) Relación UV-B/control de la velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas *GRF1^R* y salvajes. Las letras muestran diferencias significativas, al aplicar ANOVA con un $p < 0,05$.

Parámetros de crecimiento (UV-B/C)	Salvaje	GRF1 ^R	GRF1 ^R /Salvaje	P
Longitud final de la hoja	0.68	0.88	1.29	0.017
Velocidad de elongación de la hoja	0.72	0.76	1.04	0.03
Tamaño de las células maduras	1.09	0.97	0.81	NS
Producción de células	0.63	0.85	1.48	0.03
Tamaño de la DEZ	0.69	0.89	1.28	0.02
Longitud de la células que dejan la DEZ	0.91	0.86	0.95	NS
Cantidad de células en la DEZ	0.70	0.89	1.27	0.05
Duración del ciclo celular	1.01	1.13	1.12	NS
Tiempo de residencia en la EZ	1.72	2.08	1.21	0.01
Cantidad de células en la EZ	0.99	1.32	1.33	NS
Longitud de la EZ	0.91	1.75	1.92	<0.001

Tabla VI: Relación UV-B/C de los parámetros de crecimiento para plantas salvajes y GRF1^R.

Estos resultados sugieren que la inhibición del crecimiento de las hojas de plantas de maíz en respuesta a la radiación UV-B requiere de la participación del factor de transcripción GRF1, de manera similar a lo descrito para *Arabidopsis* (Casadevall y col., 2013). Sin embargo, otras vías regulatorias también estarían participando en esta respuesta, dado que las plantas *GRF1^R* no son totalmente insensibles a la inhibición del crecimiento por UV-B.

Debido a que, como se expuso anteriormente, las giberelinas presentan un pico máximo en la transición entre la DEZ y la EZ (Nelissen y col., 2012), y que los factores de transcripción GRFs y el miR396 regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de las giberelinas (Vercruyssen y col., 2011; Hewezi y col., 2012), se midieron los niveles de giberelinas en la GZ de hojas de plantas salvajes y *GRF1^R*, tanto en condiciones control como expuestas al UV-B, para investigar si la menor disminución en el tamaño de la DEZ por UV-B medida en la hoja #4 de las plantas de *GRF1^R* puede estar relacionada con cambios en los niveles de giberelinas en esta zona. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 65, donde puede observarse que, mientras que los niveles de GA19 disminuyen significativamente por UV-B a partir del segmento II en las hojas de plantas salvajes, la concentración de esta hormona es similar en ambas condiciones en el segmento II de hojas de plantas *GRF1^R*, con concentraciones similares a las determinadas en el segmento II de hojas salvajes en condiciones control. Sin embargo, en los segmentos III y IV, los niveles de GA19 bajo condiciones control difieren significativamente con los niveles de las hojas expuestas a UV-B en ambos grupos de plantas.

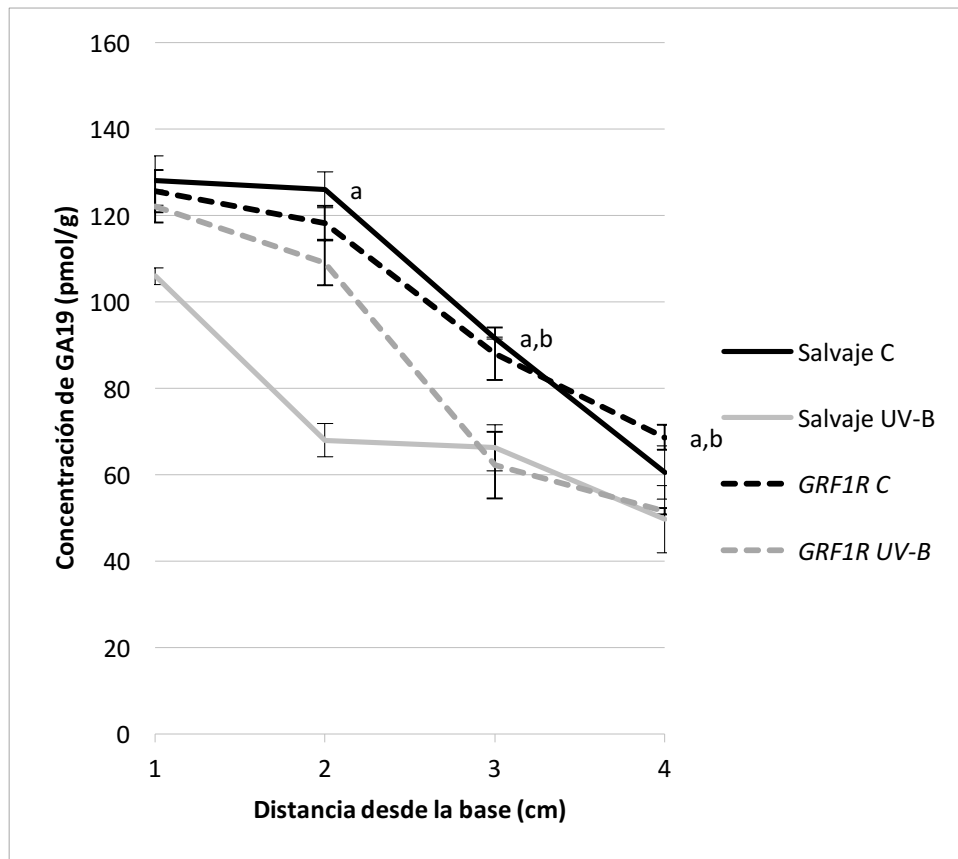


Figura 65: Concentración endógena de giberelina 19 en la GZ de hojas de plantas salvajes y *GRF1^R* expuestas a la radiación UV-B o alternativamente mantenidas en condiciones control en ausencia de UV-B. Se grafican los promedios de 3 réplicas biológicas con los errores estándares y las letras muestran diferencias significativas (a: diferencia significativa entre las plantas salvajes control y expuestas al UV-B; b: diferencias significativa entre las plantas *GRF1^R* control y expuestas al UV-B)

Por último, se determinó la longitud final y la velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas salvajes y *dwarf3* crecidas tanto en condiciones control como expuestas a la radiación UV-B (Figura 66). Las plantas *dwarf3* son plantas que presentan una mutación en la vía de síntesis de las giberelinas bioactivas y por lo tanto tienen bajos niveles de GA1 (Nelissen y col., 2012). La hoja #4 de plantas *dwarf3* presentó una menor inhibición del crecimiento por UV-B que la misma hoja de plantas salvajes, y además mostró una menor inhibición de la velocidad de elongación por UV-B que la hoja #4 de plantas salvajes, un patrón de inhibición similar al medido en las hojas de las plantas *GRF1^R*. Estos resultados nos permitirían concluir que los niveles de giberelinas en la DEZ controlada por la actividad de GRF1 (y posiblemente por otros factores de transcripción de esta familia) es una de las vías que regulan el crecimiento de las hojas en plantas de maíz expuestas a la radiación UV-B.

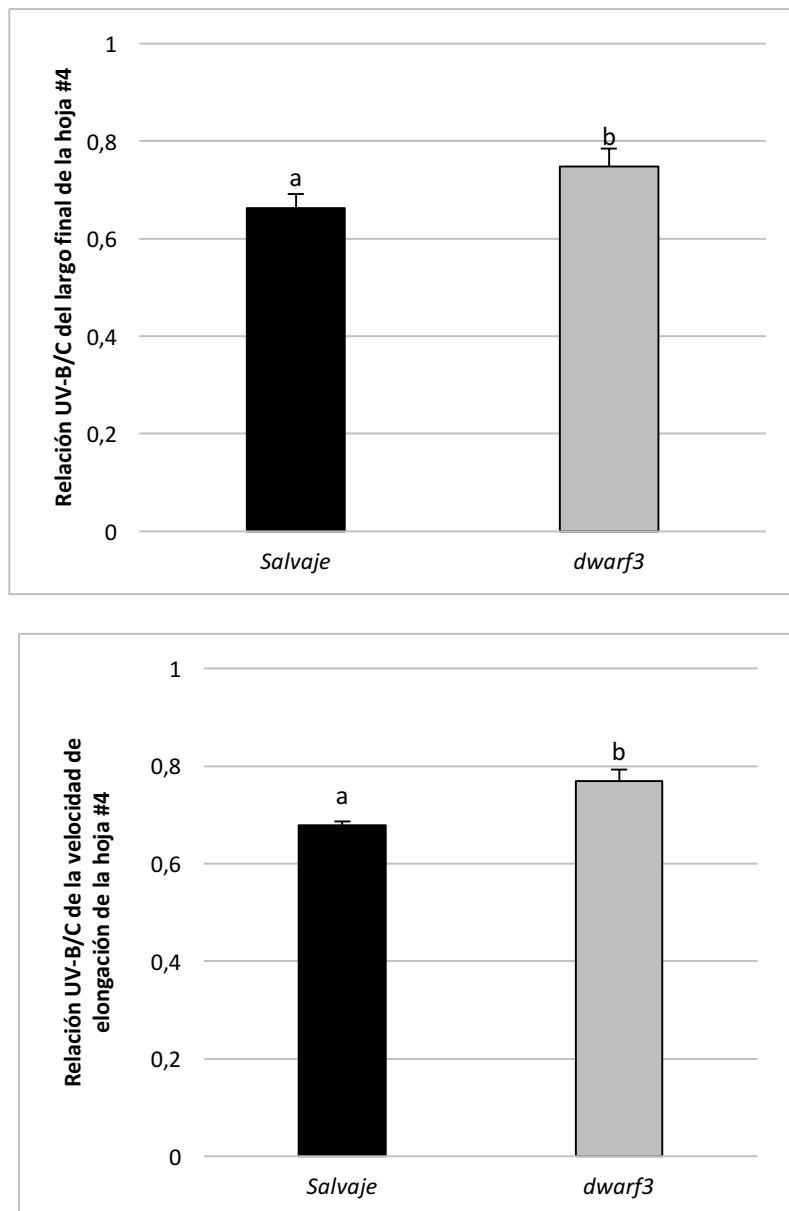


Figura 66: Relación UV-B/C del largo final y de la velocidad de elongación de la hoja #4 de plantas salvajes y *dwarf3*. Las letras muestran diferencias significativas al aplicar t de student con un $p < 0,05$.

3.4.6 Discusión y Conclusiones

Una de las características principales del crecimiento de las plantas es su naturaleza extremadamente dinámica. En particular, la radiación UV-B afecta diversos procesos del desarrollo y modifica la arquitectura de las plantas. Luego de la exposición a la radiación UV-B, se observa una reducción de la biomasa, y una reducción del largo y del área de las hojas (Farooq y col., 2005; Zinser y col., 2007; Casadevall y col., 2013; Reddy y col., 2013; Takshak y Agrawal, 2014). La inhibición del crecimiento por UV-B ha sido estudiada en distintas especies vegetales (Casati y Walbot, 2003; Kakani y col., 2003; Casadevall y col., 2013; Reddy y col., 2013; Martínez-Lüscher y col., 2015), sin embargo hasta el momento es escasa la información de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso en plantas de maíz. En el presente capítulo se presentaron evidencias que señalan que los niveles de radiación UV-B presentes en la radiación solar inhiben el crecimiento de las hojas de maíz sin causar otros síntomas visibles de estrés, incluyendo acumulación de daño en el ADN. Los resultados obtenidos demostraron que la inhibición del crecimiento es una consecuencia de la disminución en la producción celular, y que esta respuesta estaría mediada, al menos en parte, por el factor de transcripción *ZmGRF1* y los niveles de giberelinas.

En los experimentos realizados en este capítulo, se observó que la reducción del tamaño final y de la velocidad de elongación de la hoja de plantas expuestas a la radiación UV-B no se debe a una reducción del tamaño final de las células maduras. El patrón celular de hojas de plantas control y expuestas a la radiación UV-B fue similar, observándose la presencia de células pequeñas cerca de la base de la hoja, aumentando su tamaño como consecuencia de una mayor elongación hacia la punta de la hoja. Sin embargo, las hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B comienzan la etapa de elongación celular antes que las hojas de plantas control (Figura 53). Por otro lado, el tamaño final de las hojas de plantas expuestas al UV-B fue menor que el de plantas control debido a una disminución en la producción celular, que se debe a un menor número de células en división activa en la DEZ (Tabla IV). De manera similar, se ha reportado que el estrés por frío reduce la longitud final de las hojas de maíz debido a una disminución de la producción celular y no a una diferencia en el tamaño de las células maduras (Rymen y col., 2007). Sin embargo, las células de hojas de maíz expuestas al frío presentan un ciclo celular más lento que el de hojas de plantas control, a diferencia de lo que se observó en nuestro trabajo para las células de plantas expuestas a la radiación UV-B, las cuales no presentaron diferencias en la duración del ciclo celular (Tabla IV). La duración del ciclo celular generalmente es constante a través de una gran cantidad de

condiciones experimentales (Baskin, 2000), y nuestros resultados concuerdan con los trabajos reportados en respuesta a la compactación del suelo (Beemster y col., 1996) y a la sequía (Sharp y col., 2004).

Para identificar las vías involucradas en la respuesta de inhibición del crecimiento por UV-B, en particular genes que codifiquen proteínas candidatas que participen en los cambios moleculares que den como resultado un menor número de células en proliferación, se realizó un experimento de transcriptómica utilizando los primeros segmentos de la base de la hoja, que corresponden a la GZ. En este experimento se observó que la expresión de 2801 transcritos varía entre los tres segmentos analizados debido al tratamiento con radiación UV-B o debido a la interacción entre la zona de la hoja y el tratamiento. Cuando se analizaron los cambios globales de transcritos en la zona de crecimiento, se encontró que varios transcritos que codifican para enzimas del metabolismo primario y secundario son regulados por la radiación UV-B. Resulta interesante mencionar que, aunque los segmentos de la hoja analizados no se encontraban expuestos directamente a la radiación solar, los niveles de algunos transcritos involucrados en la fotosíntesis variaron en respuesta a la radiación UV-B, por lo tanto es probable que en este tejido haya una pequeña actividad fotosintética, y que dicha actividad no se encontraría regulada únicamente por la radiación fotosintéticamente activa, sino que también por la radiación UV-B. Además, como fue reportado previamente (Casati y Walbot, 2003), algunos transcritos de enzimas del metabolismo secundario aumentan por la radiación UV-B, en particular, del metabolismo de los fenilpropanoides en general, y en particular de los flavonoides. Nuevamente esto resulta interesante debido a que los segmentos analizados no se encontraban directamente expuestos a la radiación, y en general estos compuestos se inducen en las hojas porque tienen la capacidad de absorber la radiación UV-B (Liu y col., 2015). A pesar de ello, los flavonoides tienen también actividad antioxidante, por lo tanto estos compuestos se podrían inducir para reducir el estrés oxidativo que se generaría por la exposición a la radiación UV-B.

Además, los resultados de transcriptómica mostraron que transcritos de enzimas involucradas en las vías de síntesis y señalización de algunas hormonas como el ABA, las citoquininas, el ácido salicílico y el jasmónico, las giberelinas y las auxinas se encontraron diferencialmente expresados en hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B. Debido a que las hormonas cumplen roles importantes en la regulación del desarrollo y del crecimiento de las plantas, se midieron los niveles de hormonas en los primeros diez segmentos de hojas expuestas al UV-B y de hojas control para evaluar si cambios hormonales por UV-B podían explicar la inhibición

del crecimiento de las hojas. Los niveles de las hormonas ABA y ácido salicílico fueron similares en las hojas expuestas a la radiación UV-B y las hojas control. Por el contrario, existen evidencias de que los niveles de ácido abscísico aumentan ante distintas condiciones de estrés abiótico como sequía, salinidad y estrés por frío en una gran cantidad de especies vegetales (Revisados en Sah y col., 2016). Por otro lado, el ácido salicílico también se encuentra involucrado en la respuesta al estrés abiótico (Yuan y Lin, 2008). Sin embargo, los efectos del ácido salicílico en la resistencia de las plantas a diferentes estreses abióticos son variados, y por lo tanto el rol del ácido salicílico en estas respuestas es poco claro (Yuan y Lin, 2008). A diferencia del ABA y del ácido salicílico, los niveles de ácido jasmónico fueron mayores en la mayoría de los segmentos estudiados de las hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B; resultados similares fueron obtenidos en hojas de arroz en respuesta a estrés por sequía y por frío (Du y col., 2013). Resulta interesante mencionar que en el experimento de ARN-seq se encontró que el transcripto *TASSEL SEED1*, que codifica para una lipooxigenasa involucrada en la síntesis de jasmonatos en plantas de maíz, se encuentra inducido en las hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B, lo que podría explicar en parte el incremento en los niveles de ácido jasmónico en las hojas expuestas al UV-B.

Por otro lado, los resultados mostraron que los niveles de la auxina ácido indolacético se encuentran disminuidos en hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B. En concordancia con estos resultados, Du y col. (2013) mostraron que hojas de arroz sometidas a estrés por sequía poseen niveles reducidos de auxinas. La expresión de algunos genes que codifican para proteínas que regulan el crecimiento es activada por fitohormonas. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la expresión de la proteína ARGOS está fuertemente inducida por auxinas (Lenhard, 2015). Esta proteína promueve la proliferación celular mediante la estimulación de la expresión de la proteína de unión a ADN AINTEGUMENTA (ANT). Además, plantas mutantes de *Arabidopsis argos* y *ant* poseen hojas más pequeñas con un número reducido de células (Lenhard, 2015). De acuerdo a esto, nuestros resultados mostraron que las hojas de plantas expuestas a la radiación UV-B poseen una menor cantidad de células, niveles reducidos de auxinas y una expresión disminuida de un factor de transcripción con similitud de secuencia a AINTEGUMENTA de *Arabidopsis* en el segmento II de hojas expuestas a la radiación UV-B en comparación a los niveles en el mismo segmento de hojas control.

Además, en nuestros experimentos se determinó que la hormona giberelina 19 posee niveles disminuidos en hojas expuestas a la radiación UV-B; de manera similar a lo observado para otros tipos de estrés como sequía, salinidad y estrés por

frío (Colebrook y col., 2014). La GA19 es la hormona precursora de la giberelina bioactiva GA1 (Nelissen y col., 2012); sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para medir otras giberelinas, no obtuvimos resultados satisfactorios. En *Arabidopsis*, las giberelinas promueven la expansión y la proliferación celular a través de la degradación de las proteínas DELLA (Achard y col., 2009), y plantas mutantes de maíz *dwarf3*, que poseen inactiva la biosíntesis de GA1, mostraron tener hojas más pequeñas que las plantas salvajes, debido a que las mismas poseen una menor cantidad de células en división (Nelissen y col., 2012). Además, en nuestros experimentos demostramos que las mutantes *dwarf3* son menos sensibles a la radiación UV-B y por lo tanto menores niveles de giberelinas podrían explicar, en parte, el fenotipo observado de las plantas salvajes frente a dicha radiación.

Una segunda vía importante que regula la proliferación y la expansión celular es la mediada por los factores de transcripción de la familia TCP (del inglés “TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA AND PCF5”) y algunos miARNs. Existen dos clases de factores de transcripción TCP. Los TCP de clase II regulan la expresión del miARN396 en *Arabidopsis*, el cual a su vez regula la expresión de algunos de los factores de transcripción de la familia GRF (Lenhard, 2015). Los GRFs han sido ampliamente estudiados (Revisado en Omidbakhshfard y col., 2015), y existen evidencias de que hay una interconexión entre la vía de regulación del crecimiento de las plantas mediada por GRFs y las vías mediadas por algunas fitohormonas (Liu y col., 2009; Vercruyssen y col., 2011; Hewezi y Baum, 2012). Por un lado, en plantas de *Arabidopsis* mutantes *grf1grf2grf3*, dos genes involucrados en la vía de síntesis de giberelinas, *AtGA3ox1* y *AtGA20ox*, se encuentran reprimidos (Hewezi y col., 2012); y consistentemente con estos resultados, Liu y col. (2009) observaron que plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del miR396 presentan un fenotipo de enanismo. Resulta interesante mencionar que la hormona auxina estimula la transcripción de los genes *GA20ox1* y *GA20ox2*, generando una regulación positiva entre la vía de las auxinas y las giberelinas (Vanstraelen y Benková, 2012). En concordancia con estos resultados, en nuestros experimentos observamos que, a diferencia de las plantas salvajes, los niveles de giberelinas no disminuyen en el segmento II de la GZ de plantas *GRF1^R* expuestas a la radiación UV-B. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la radiación UV-B induce la expresión del miR396 en la GZ. Es interesante mencionar en este punto que el patrón de expresión del miR396 es opuesto al patrón de expresión de los transcriptos del grupo 2 del experimento de ARNseq (Figuras 58 y 62), donde se incluyen *GRF1*, *GRF2*, *GRF14* y *GRF15*, sugiriendo que la mayor expresión del

miR396 por UV-B y a lo largo de la hoja podría ser una causa de la disminución de la expresión de estos *GRFs*, consistente con lo previamente reportado para *Arabidopsis* (Casadevall y col., 2013). Por otro lado, nuestros resultados demostraron que plantas de maíz que sobreexpresan el factor de transcripción GRF1 insensible al miR396 muestran una menor inhibición del crecimiento de las hojas por UV-B que las plantas salvajes, dado que las mismas presentaron una menor inhibición de la velocidad de elongación de la hoja #4. Se demostró que la menor inhibición de la elongación de la hoja se debe a una menor disminución del tamaño de la DEZ, debido a una menor disminución de la cantidad de células en división activa. Por lo tanto, debido a que la radiación UV-B causa una disminución del tamaño de la hoja de maíz debido a que las mismas poseen una menor cantidad de células en la DEZ, los resultados obtenidos con las plantas GRF1^R sugieren que dicha respuesta a la radiación UV-B requiere de la participación del factor de transcripción GRF1. Sin embargo, debido a que las plantas GRF1^R no mostraron ser totalmente insensibles a la radiación UV-B, es posible que otros factores estén participando de esta respuesta. Por ejemplo, una posible hipótesis sería que la represión de la expresión de algunos *GRFs* mediada por el miR396 causada por la radiación UV-B resultaría en menores niveles de genes de la vía de síntesis de las giberelinas y mayores niveles de genes del catabolismo de giberelinas, de acuerdo a los resultados de los experimentos de transcriptómica y a los obtenidos por Hewezi y col. (2012). Estos cambios transcripcionales producirían menores niveles de giberelinas en las hojas de plantas expuestas al UV-B, y traería como consecuencia la inhibición del crecimiento de las mismas (Figura 67).

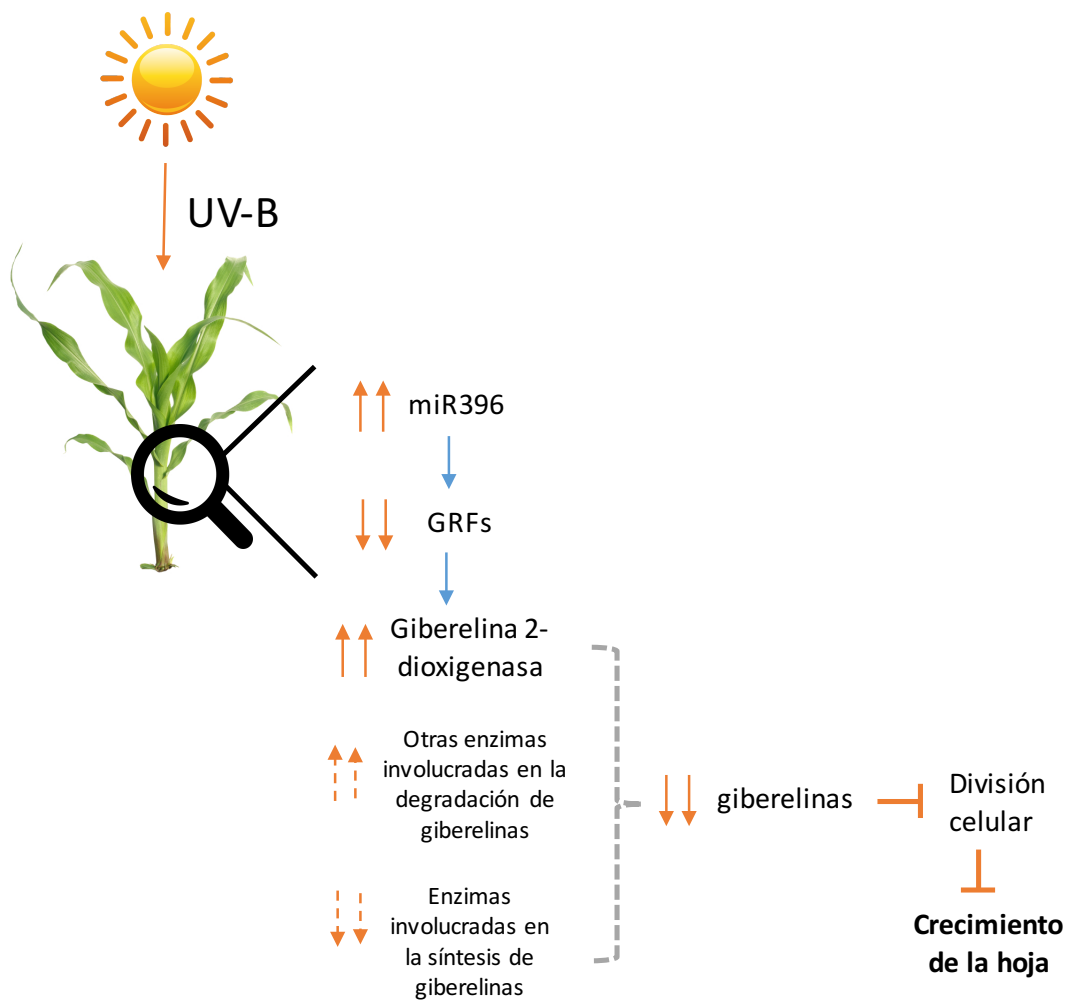


Figura 67: Modelo propuesto del mecanismo mediante el cual la radiación UV-B inhibe el crecimiento de la hoja.

4 Conclusiones

Las conclusiones finales de este trabajo de tesis son las siguientes:

Las histonas acetiltransferasas tienen diferentes roles durante la exposición a la radiación UV-B en Arabidopsis

Los resultados presentados en este trabajo, junto con datos anteriores, demuestran que las histonas acetiltransferasas tienen diferentes roles durante la exposición a la radiación UV-B en Arabidopsis. Mientras que las histonas acetiltransferasas de la familia HAM son necesarias para la reparación eficiente del daño en el ADN causado por el UV-B; HAG3, HAF1 y HAC1 regulan la expresión de genes de respuesta al UV-B en Arabidopsis que son necesarios para el desarrollo de las plantas en respuesta a esta radiación. Particularmente, en esta Tesis demostramos que HAG3 regula la expresión de genes que participan en la vía de señalización de UV-B, HAF1 participa en la regulación de la expresión de los factores de transcripción E2F/DP que son importantes reguladores de los ciclos celulares mitótico y de endorreproducción, y HAC1 participa en la regulación de transcritos que participan en la vía de floración.

Por otro lado, las otras histonas acetiltransferasas no participarían en las respuestas frente a la radiación UV-B analizadas en este trabajo, en las condiciones evaluadas. Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras HATs en diferentes aspectos de las respuestas UV-B en Arabidopsis, o que las mismas posean funciones redundantes.

Los niveles de radiación UV-B presentes en la radiación solar inhiben el crecimiento de las hojas de maíz, y esta respuesta está mediada, en parte, por el factor de transcripción ZmGRF1.

Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de radiación UV-B presentes en la radiación solar inhiben el crecimiento de las hojas de maíz sin causar otros síntomas visibles de estrés, incluyendo acumulación de daño en el ADN. Además, demuestran que la inhibición del crecimiento es una consecuencia de la disminución en la producción celular, y que esta respuesta estaría mediada por el factor de transcripción ZmGRF1 y por transcritos de enzimas que participan en distintas vías metabólicas de las fitohormonas. La disminución del tamaño de la GZ

causada por la radiación UV-B se correlaciona con una disminución en la concentración de giberelinas, la cual está regulada, al menos en parte, por la expresión de GRF1 y posiblemente por otros factores de la familia GRF.

5 Referencias bibliográficas

- A.-H.-Mackerness S., S. (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regul.* 32: 27-39.
- Abreu, M. E. y Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60: 1261-1271.
- Achard, P.; Gusti, A.; Cheminant, S.; Alioua, M.; Dhondt, S.; Coppens, F.; Beemster, G. T. S.; y Genschik, P. (2009) Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 19: 1188-1193.
- Agarwal, S. (2007) Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biol. Plant.* 51: 157-160.
- Aggarwal, A.; Kumari, R.; Mehla, N.; Rishi Pal Singh, D.; Bhatnagar, S.; Sharma, K.; Sharma, K.; Vashishtha, A.; y Rathi, B. (2013) Depletion of the Ozone Layer and Its Consequences : A Review. *Am. J. Plant Sci.* 4: 1990-1997.
- Ahmad, P.; Rasool, S.; Gul, A.; Sheikh, S. A.; Akram, N. A.; Ashraf, M.; Kazi, A. M.; y Gucel, S. (2016) Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 7.:
- Alonso, R.; Berli, F. J.; Bottini, R.; y Piccoli, P. (2015) Acclimation mechanisms elicited by sprayed abscisic acid, solar UV-B and water deficit in leaf tissues of field-grown grapevines. *Plant Physiol. Biochem.* 91: 56-60.
- Andriankaja, M.; Dhondt, S.; DeBodt, S.; Vanhaeren, H.; Coppens, F.; DeMilde, L.; Mühlenbock, P.; Skirycz, A.; Gonzalez, N.; Beemster, G. T. S.; y Inzé, D. (2012) Exit from Proliferation during Leaf Development in *Arabidopsis thaliana*: A Not-So-Gradual Process. *Dev. Cell* 22: 64-78.
- Bajguz, A. y Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 1-8.
- Barow, M. y Meister, A. (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell Environ.* 26: 571-584.
- Baskin, T. I. (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Mol. Biol.* 43: 545-554.
- Baucher, M.; Moussawi, J.; Vandeputte, O. M.; Monteyne, D.; Mol, A.; Pérez-Morga, D.; y El Jaziri, M. (2013) A role for the miR396/GRF network in specification of organ type during flower development, as supported by ectopic expression of *Populus trichocarpa* miR396c in transgenic tobacco. *Plant Biol.* 15: 892-898.
- Beemster, G. T. S.; Beemster, G. T. S.; Masle, J.; Masle, J.; Williamson, R. E.;

- Williamson, R. E.; Farquhar, G. D.; y Farquhar, G. D. (1996) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L): kinematic analysis of leaf elongation. *J. Exp. Bot.* 47: 1663-1678.
- Benhamed, M.; Bertrand, C.; Servet, C.; y Zhou, D.-X. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 2893-2903.
- Berckmans, B.; Lammens, T.; Van Den Daele, H.; Magyar, Z.; Bögre, L.; y De Veylder, L. (2011) Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol.* 157: 1440-51.
- Berger, S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407-412.
- Berli, F. J.; Moreno, D.; Piccoli, P.; Hespanhol-Viana, L.; Silva, M. F.; Bressan-Smith, R.; Cavagnaro, J. B.; y Bottini, R. (2010) Absciscic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant Cell Env.* 33: 1-10.
- Berr, A.; McCallum, E. J.; Ménard, R.; Meyer, D.; Fuchs, J.; Dong, A.; y Shen, W.-H. (2010) Arabidopsis SET DOMAIN GROUP2 is required for H3K4 trimethylation and is crucial for both sporophyte and gametophyte development. *Plant Cell* 22: 3232-3248.
- Berr, A.; Shafiq, S.; y Shen, W.-H. (2011) Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1809: 567-76.
- Berr, A.; Xu, L.; Gao, J.; Cognat, V.; Steinmetz, A.; Dong, A.; y Shen, W.-H. (2009) SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in FLOWERING LOCUS C activation and repression of flowering. *Plant Physiol.* 151: 1476-1485.
- Bertrand, C.; Benhamed, M.; Li, Y. F.; Ayadi, M.; Lemonnier, G.; Renou, J. P.; Delarue, M.; y Zhou, D. X. (2005) Arabidopsis HAF2 gene encoding TATA-binding protein (TBP)-associated factor TAF1, is required to integrate light signals to regulate gene expression and growth. *J. Biol. Chem.* 280: 1465-1473.
- Besteiro, M. A. G.; Bartels, S.; Albert, A.; y Ulm, R. (2011) Arabidopsis MAP kinase phosphatase 1 and its target MAP kinases 3 and 6 antagonistically determine UV-B stress tolerance, independent of the UVR8 photoreceptor pathway. *Plant J.* 68: 727-737.
- Bieza, K. y Lois, R. (2001) An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.* 126: 1105-1115.

- Blokhina, O.; Virolainen, E.; y Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
- Boss, P. K.; Bastow, R. M.; Mylne, J. S.; y Dean, C. (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16 Suppl: S18-S31.
- Boycheva, I.; Vassileva, V.; y Iantcheva, A. (2014) Histone acetyltransferases in plant development and plasticity. *Curr. Genomics* 15: 28.
- Bramsiepe, J.; Wester, K.; Weinl, C.; Roodbarkelari, F.; Kasili, R.; Larkin, J. C.; Hülkamp, M.; y Schnittger, A. (2010) Endoreplication controls cell fate maintenance. *PLoS Genet.* 6: 1-14.
- Britt, A. y Fiscus, E. L. (2003) Growth responses of Arabidopsis DNA repair mutants to solar irradiation. *Physiol. Plant.* 118: 183-192.
- Brown, B. A.; Cloix, C.; Jiang, G. H.; Kaiserli, E.; Herzyk, P.; Kliebenstein, D. J.; y Jenkins, G. I. (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 18225-30.
- Brown, B. A. y Jenkins, G. I. (2007) UV-B Signaling Pathways with Different Fluence-Rate Response Profiles Are Distinguished in Mature Arabidopsis Leaf Tissue by Requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol.* 146: 576-588.
- Campi, M.; D'Andrea, L.; Emiliani, J.; y Casati, P. (2012) Participation of chromatin-remodeling proteins in the repair of ultraviolet-B-damaged DNA. *Plant Physiol.* 158: 981-95.
- Campillo, C.; Fortes, R.; y Prieto, M. (2012) Solar Radiation Effect on Crop Production. *Sol. Radiat.*
- Cao, Y.; Dai, Y.; Cui, S.; y Ma, L. (2008) Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2586-2602.
- Carabelli, M.; Possenti, M.; Sessa, G.; Ciolfi, A.; Sassi, M.; Morelli, G.; y Ruberti, I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity service Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* 1863-1868.
- Casadevall, R.; Rodriguez, R. E.; Debernardi, J. M.; Palatnik, J. F.; y Casati, P. (2013) Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* 25: 3570-83.
- Casati, P.; Stapleton, A. E.; Blum, J. E.; y Walbot, V. (2006) Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant J.* 46: 613-627.

- Casati, P. y Walbot, V. (2003) Gene Expression Profiling in Response to Ultraviolet Radiation in Maize Genotypes with Varying. *Society* 132: 1739-1754.
- Chan, S. W. L.; Henderson, I. R.; y Jacobsen, S. E. (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 6: 351-360.
- Chen, H.; Feng, Y.; Wang, L.; Yonezawa, T.; Crabbe, M. J. C.; Zhang, X.; y Zhong, Y. (2014) Transcriptome profiling of the UV-B stress response in the desert shrub *Lycium ruthenicum*. *Mol. Biol. Rep.* 42: 639-649.
- Chen, J. y Tian, L. (2011) Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. 4: 295-307.
- Chen, T. y Li, E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 60: 55-89.
- Chen, Y. F.; Etheridge, N.; y Schaller, G. E. (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* 95: 901-915.
- Chen, Z.; Zhang, H.; Jablonowski, D.; Zhou, X.; Ren, X.; Hong, X.; Schaffrath, R.; Zhu, J.-K.; y Gong, Z. (2006) Mutations in ABO1/ELO2, a subunit of holo-Elongator, increase abscisic acid sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 6902-6912.
- Cheon, J.; Park, S.-Y.; Schulz, B.; y Choe, S. (2010) *Arabidopsis* brassinosteroid biosynthetic mutant dwarf7-1 exhibits slower rates of cell division and shoot induction. *BMC Plant Biol.* 10: 270.
- Chua, Y. L.; Brown, a P.; y Gray, J. C. (2001) Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene. *Plant Cell* 13: 599-612.
- Clouse, S. D. (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23: 1219-30.
- Colebrook, E. H.; Thomas, S. G.; Phillips, A. L.; y Hedden, P. (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* 217: 67-75.
- Consejo Internacional de Cereales (IGC) (2015) Informe de Mercado de Cereales. 461: 1-7.
- Creppe, C.; Malinouskaya, L.; Volvert, M. L.; Gillard, M.; Close, P.; Malaise, O.; Laguesse, S.; Cornez, I.; Rahmouni, S.; Ormenese, S.; Belachew, S.; Malgrange, B.; Chapelle, J. P.; Siebenlist, U.; Moonen, G.; Chariot, A.; y Nguyen, L. (2009) Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α -Tubulin. *Cell* 136: 551-564.
- Culligan, K.; Tissier, A.; y Britt, A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle

- checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 1091-1104.
- Curaba, J.; Singh, M. B.; y Bhalla, P. L. (2014) MiRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *J. Exp. Bot.* 65: 1425-1438.
- Defraia, C. T.; Zhang, X.; y Mou, Z. (2010) Elongator subunit 2 is an accelerator of immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 64: 511-523.
- Deng, W.; Liu, C.; Pei, Y.; Deng, X.; Niu, L.; y Cao, X. (2007) Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1660-8.
- Ding, Y.; Avramova, Z.; y Fromm, M. (2011) The *Arabidopsis* trithorax-like factor ATX1 functions in dehydration stress responses via ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Plant J.* 66: 735-744.
- Donnelly, P. M.; Bonetta, D.; Tsukaya, H.; Dengler, R. E.; y Dengler, N. G. (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 215: 407-19.
- Du, H.; Liu, H.; y Xiong, L. (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4: 397.
- Earley, K. W.; Shook, M. S.; Brower-Toland, B.; Hicks, L.; y Pikaard, C. S. (2007) In vitro specificities of *Arabidopsis* co-activator histone acetyltransferases: Implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J.* 52: 615-626.
- El-yazal, S. A. S.; El-yazal, M. A. S.; Dwidar, E. F.; y Rady, M. M. (2015) Phytohormone Crosstalk Research: Cytokinin and its Crosstalk with Other Phytohormones. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1-11.
- Farooq, M.; Shankar, U.; Ray, R. S.; Misra, R. B.; Agrawal, N.; Verma, K.; y Hans, R. K. (2005) Morphological and metabolic alterations in duckweed (*Spirodela polyrrhiza*) on long-term low-level chronic UV-B exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62: 408-414.
- Favory, J.-J.; Stec, A.; Gruber, H.; Rizzini, L.; Oravec, A.; Funk, M.; Albert, A.; Cloix, C.; Jenkins, G. I.; Oakeley, E. J.; Seidlitz, H. K.; Nagy, F.; y Ulm, R. (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 28: 591-601.
- Fellows, J.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; y Svejstrup, J. Q. (2000) The Elp2 subunit of elongator and elongating RNA polymerase II holoenzyme is a WD40 repeat protein. *J. Biol. Chem.* 275: 12896-12899.
- Feng, J. y Shen, W. H. (2014) Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Front Plant Sci* 5: 83.

- Fina, J. P. y Casati, P. (2015) Plant and Cell Physiology Advance Access published April 14, 2011.
- Finkemeier, I.; Laxa, M.; Miguet, L.; Howden, A. J. M.; y Sweetlove, L. J. (2011) Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 1779-90.
- Finnegan, E. J. y Kovac, K. a (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* 43: 189-201.
- Fiorani, F.; Beemster, G. T. S.; Bultynck, L.; y Lambers, H. (2000) Can Meristematic Activity Determine Variation in Leaf Size and Elongation Rate among Four Poa Species? A Kinematic Study. *Plant Physiol.* 124: 854-855.
- Franc, V.; Šebela, M.; Řehulka, P.; Končítíková, R.; Lenobel, R.; Madzak, C.; y Kopečný, D. (2012) Analysis of N-glycosylation in maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1 using a manual microgradient chromatographic separation coupled offline to MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *J. Proteomics* 75: 4027-4037.
- Franklin, K. A. y Whitelam, G. C. (2004) Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J. Exp. Bot.* 55: 271-276.
- Friedberg, E. C. (2003) DNA damage and Repair. 421.:
- Gao, Q. y Zhang, L. (2008) Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* 165: 138-148.
- Gegas, V. C.; Wargent, J. J.; Pesquet, E.; Granqvist, E.; Paul, N. D.; y Doonan, J. H. (2014) Endopolyploidy as a potential alternative adaptive strategy for Arabidopsis leaf size variation in response to UV-B. *J. Exp. Bot.* 65: 2757-2766.
- Gill, S. S. y Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- González Besteiro, M. A. y Ulm, R. (2013) ATR and MKP1 play distinct roles in response to UV-B stress in Arabidopsis. *Plant J.* 73: 1034-1043.
- Gonzalez, N.; Vanhaeren, H.; y Inzé, D. (2012) Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci.* 17: 332-340.
- Goodman, R. H. y Smolik, S. (2000) CBP / p300 in cell growth , transformation , and development. *Genes Dev.* 14: 1553-1577.
- Granier, C. y Tardieu, F. (2009) Multi-scale phenotyping of leaf expansion in response to environmental changes: The whole is more than the sum of parts. *Plant, Cell Environ.* 32: 1175-1184.
- Gruber, H.; Heijde, M.; Heller, W.; Albert, A.; Seidlitz, H. K.; y Ulm, R. (2010) Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress

- acclimation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 20132-7.
- Gutierrez, C.; Ramirez-Parra, E.; Castellano, M. M.; y Del Pozo, J. C. (2002) G1 to S transition: More than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 480-486.
- Ha, S.; Vankova, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; y Tran, L. S. P. (2012) Cytokinins: Metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 17: 172-179.
- Han, C.; Liu, Q.; y Yang, Y. (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul.* 58: 153-162.
- Han, S. K.; Song, J. D.; Noh, Y. S.; y Noh, B. (2007) Role of plant CBP/p300-like genes in the regulation of flowering time. *Plant J.* 49: 103-114.
- Hase, Y.; Trung, K. H.; Matsunaga, T.; y Tanaka, A. (2006) A mutation in the *uvi4* gene promotes progression of endo-reduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *Plant J.* 46: 317-326.
- Haynes, S. R.; Dollard, C.; Winston, F.; Beck, S.; Trowsdale, J.; y Dawid, I. B. (1992) The bromodomain: A conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 20: 2603.
- He, Y. y Amasino, R. M. (2005) Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci.* 10: 30-35.
- Hectors, K.; Jacques, E.; Prinsen, E.; Guisez, Y.; Verbelen, J. P.; Jansen, M. A. K.; y Vissenberg, K. (2010) UV radiation reduces epidermal cell expansion in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 61: 4339-4349.
- Hefner, E.; Preuss, S. B.; y Britt, A. B. (2003) Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J. Exp. Bot.* 54: 669-680.
- Heijde, M. y Ulm, R. (2013) Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 1113-8.
- Heinrich, M.; Hettenhausen, C.; Lange, T.; W??nsche, H.; Fang, J.; Baldwin, I. T.; y Wu, J. (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J.* 73: 591-606.
- Hewezi, T. y Baum, T. J. (2012) Complex feedback regulations govern the expression of miRNA396 and its GRF target genes. *Plant Signal. Behav.* 7: 749-51.
- Hewezi, T.; Maier, T. R.; Nettleton, D.; y Baum, T. J. (2012) The Arabidopsis MicroRNA396-GRF1/GRF3 Regulatory Module Acts as a Developmental

- Regulator in the Reprogramming of Root Cells during Cyst Nematode Infection. *Plant Physiol.* 159: 321-335.
- Hopkins, L.; Bond, M. A.; Tobin, A. K.; Harold, S.; Building, M.; y Andrews, S. (2002) Ultraviolet-B radiation reduces the rates of cell division and elongation in the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L . cv Maris Huntsman) ABSTRACT. 617-624.
- Horiguchi, G. y Tsukaya, H. (2011) Organ Size Regulation in Plants: Insights from Compensation. *Front. Plant Sci.* 2: 1-6.
- Hossain, M. A.; Bhattacharjee, S.; Armin, S. M.; Qian, P. P.; Xin, W.; Li, H. Y.; Burritt, D. J.; Fujita, M.; y Tran, L. S. P. (2015) Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front. Plant Sci.* 6: 19.
- Hu, Y.; Xie, Q.; y Chua, N. (2003) The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral. 15: 1951-1961.
- Huang, B.; Johansson, M. J. O.; y Byström, A. S. (2005) An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 11: 424-436.
- Illumina Inc. (2013) HiSeq ® 2500 Sequencing System. 8-9.
- Illumina Inc. (2014) TruSeq RNA Sample Preparation v2 Guide.
- Inze, D. y De Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40: 77-105.
- Jaillais, Y. y Chory, J. (2011) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. 17: 642-645.
- Jansen, M. A. K.; Gaba, V.; y Greenberg, B. M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3: 131-135.
- Jeanmougin, F.; Wurtz, J. M.; Le Douarin, B.; Chambon, P.; y Losson, R. (1997) The bromodomain revisited. *Trends Biochem. Sci.* 22: 151-153.
- Jenkins, G. (2014) The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *Plant Cell* 26: 21-37.
- Jenkins, G. I. (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* 60: 407-431.
- Jiang, C. Z.; Yee, J.; Mitchell, D. L.; y Britt, A. B. (1997) Photorepair mutants of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 7441-5.
- Jiang, C. Z.; Yen, C. N.; Cronin, K.; Mitchell, D.; y Britt, A. B. (1997) UV- and gamma-radiation sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Genetics* 147: 1401-1409.
- Jin, H.; Cominelli, E.; Bailey, P.; Parr, A.; Mehrtens, F.; Jones, J.; Tonelli, C.; Weisshaar, B.; y Martin, C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4

- controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *EMBO J.* 19: 6150-6161.
- Kakani, V. G.; Reddy, K. R.; Zhao, D.; y Mohammed, A. R. (2003) Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. *Ann. Bot.* 91: 817-826.
- Kakani, V. G.; Reddy, K. R.; Zhao, D.; y Sailaja, K. (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: A review. *Agric. For. Meteorol.* 120: 191-218.
- Kalve, S.; De Vos, D.; y Beemster, G. T. S. (2014) Leaf development: a cellular perspective. *Front. Plant Sci.* 5: 362.
- Kazan, K. y Lyons, R. (2016) The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 67: 47-60.
- Khan, M. I. R.; Fatma, M.; Per, T. S.; Anjum, N. a; y Khan, N. a (2015) Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6: 462.
- Kilian, J.; Whitehead, D.; Horak, J.; Wanke, D.; Weinl, S.; Batistic, O.; D'Angelo, C.; Bornberg-Bauer, E.; Kudla, J.; y Harter, K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50: 347-363.
- Kim, J. H.; Choi, D.; y Kende, H. (2003) The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J.* 36: 94-104.
- Kimura, S. y Sakaguchi, K. (2006) DNA repair in plants. *Chem. Rev.* 106: 753-766.
- van der Knaap, E.; Kim, J. H.; y Kende, H. (2000) A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol.* 122: 695-704.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128: 693-705.
- Koyama, T.; Mitsuda, N.; Seki, M.; Shinozaki, K.; y Ohme-Takagi, M. (2010) TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 3574-88.
- Krogan, N. J. y Greenblatt, J. F. (2001) Characterization of a Six-Subunit Holo-Elongator Complex Required for the Regulated Expression of a Group of Genes in *Saccharomyces cerevisiae* Characterization of a Six-Subunit Holo-Elongator Complex Required for the Regulated Expression of a Group of Gen. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8203-8212.

- Kwak, S. H.; Song, S. K.; Lee, M. M.; y Schiefelbein, J. (2015) ANGUSTIFOLIA mediates one of the multiple SCRAMBLED signaling pathways regulating cell growth pattern in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 465: 587-593.
- Lammens, T.; Li, J.; Leone, G.; y De Veylder, L. (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family The E2F family of transcription factors. *Trends Cell Biol* 19: 111-118.
- Landry, L. C.; Chapple, C. C. S.; y Last, R. 1 (1995) Arabidopsis Mutants Lacking Phenolic Sunscreens Exhibit Enhanced Ultraviolet-B Injury and Oxidative Damage'. *Plant Physiol* 109: 59-1.
- Landry, L. G.; Stapleton, A. E.; Lim, J.; Hoffman, P.; Hays, J. B.; Walbot, V.; y Last, R. L. (1997) An Arabidopsis photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 328-32.
- Law, J. A. y Jacobsen, S. E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204-220.
- Lawit, S. J.; O'Grady, K.; Gurley, W. B.; y Czarnecka-Verner, E. (2007) Yeast two-hybrid map of Arabidopsis TFIID. *Plant Mol. Biol.* 64: 73-87.
- Lee, H. O.; Davidson, J. M.; y Duronio, R. J. (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 2461-2477.
- Lee, J. y Lee, I. (2010) Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 61: 2247-2254.
- Lee, J. S.; Smith, E.; y Shilatifard, A. (2010) The Language of Histone Crosstalk. *Cell* 142: 682-685.
- Lenhard, M. (2015) Size Control in Plants — Lessons from Leaves. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1-17.
- Li, C.; Xu, J.; Li, J.; Li, Q.; y Yang, H. (2014) Involvement of Arabidopsis HAC family genes in pleiotropic developmental processes. *Plant Signal. Behav.* 9: 24-26.
- Li, J.; Ou-Lee, T. M.; Raba, R.; Amundson, R. G.; y Last, R. L. (1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.
- Lidon, F. C. y Ramalho, J. C. (2011) Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 104: 457-466.
- Light, K. M.; Wisniewski, J. A.; Vinyard, W. A.; y Kieber-Emmons, M. T. (2016) Perception of the plant hormone ethylene: known-knowns and known-unknowns. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*
- Lin, R.; Ding, L.; Casola, C.; Ripoll, D. R.; Feschotte, C.; y Wang, H. (2007) Transposase-Derived Transcription in Arabidopsis. *Science* (80-.). 318: 1302-

1305.

- Lin, Z.; Zhong, S.; y Grierson, D. (2009) Recent advances in ethylene research. *J. Exp. Bot.* 60: 3311-3336.
- Liu, D.; Song, Y.; Chen, Z.; y Yu, D. (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiol. Plant.* 136: 223-236.
- Liu, J.; Rice, J. H.; Chen, N.; Baum, T. J.; y Hewezi, T. (2014) Synchronization of developmental processes and defense signaling by growth regulating transcription factors. *PLoS One* 9: 1-14.
- Liu, M.; Li, X.; Liu, Y.; Shi, Y.; y Ma, X. (2015) Analysis of differentially expressed genes under UV-B radiation in the desert plant *Reaumuria soongorica*. *Gene* 574: 265-272.
- Liu, Z.; Hong, S. W.; Escobar, M.; Vierling, E.; Mitchell, D. L.; Mount, D. W.; y Hall, J. D. (2003) Arabidopsis UVH6, a homolog of human XPD and yeast RAD3 DNA repair genes, functions in DNA repair and is essential for plant growth. *Plant Physiol* 132: 1405-1414.
- Liu, Z.; Hossain, G. S.; Islas-Osuna, M. A.; Mitchell, D. L.; y Mount, D. W. (2000) Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *Plant J.* 21: 519-528.
- Ljung, K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140: 943-50.
- Luo, L.; Ando, S.; Sasabe, M.; Machida, C.; Kurihara, D.; Higashiyama, T.; y Machida, Y. (2012) Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 protein required for leaf morphogenesis consistently forms speckles during mitosis of tobacco BY-2 cells via signals in its specific sequence. *J. Plant Res.* 125: 661-668.
- Luo, M.; Hung, F. Y.; Yang, S.; Liu, X.; y Wu, K. (2014) Histone Lysine Demethylases and Their Functions in Plants. *Plant Mol. Biol. Report.* 32: 558-565.
- Lyons, R.; Manners, J. M.; y Kazan, K. (2013) Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: A comparative overview. *Plant Cell Rep.* 32: 815-827.
- Mackerness, A, S.; John, C. F.; Jordan, B.; y Thomas, B. (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* 489: 237-242.
- Manova, V. y Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6: 885.
- Mao, Y.; Pavangadkar, K. A.; Thomashow, M. F.; y Triezenberg, S. J. (2006) Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional

- coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1759: 69-79.
- Mariconti, L.; Pellegrini, B.; Cantoni, R.; Stevens, R.; Bergounioux, C.; Cella, R.; y Albani, D. (2002) The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J. Biol. Chem.* 277: 9911-9919.
- Martínez-Lüscher, J.; Morales, F.; Delrot, S.; Sánchez-Díaz, M.; Gomés, E.; Aguirreolea, J.; y Pascual, I. (2013) Short- and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. *Plant Sci.* 213: 114-122.
- Martínez-Lüscher, J.; Morales, F.; Delrot, S.; Sánchez-Díaz, M.; Gomès, E.; Aguirreolea, J.; y Pascual, I. (2015) Characterization of the adaptive response of grapevine (cv. Tempranillo) to UV-B radiation under water deficit conditions. *Plant Sci.* 232: 13-22.
- Massonnet, C.; Tisne, S.; Radziejowski, a.; Vile, D.; De Veylder, L.; Dauzat, M.; y Granier, C. (2011) New Insights into the Control of Endoreduplication: Endoreduplication Could Be Driven by Organ Growth in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiol.* 157: 2044-2055.
- Mazza, C. a; Boccalandro, H. E.; Giordano, C. V; Battista, D.; Scopel, a L.; y Ballaré, C. L. (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol.* 122: 117-26.
- McGinty, R. K.; Tan, S.; Steunou, A. L.; Rossetto, D.; y Côté, J. (2014) Fundamentals of Chromatin. *Fundam. Chromatin* 9781461486: 1-28.
- Meijkamp, B. B.; Doodeman, G.; y Rozema, J. (2001) Section 4 : Interactions of UV-B Radiation with Other Factors of. *Plant Ecol.* 135-146.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; y Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498.
- Mizukami, Y. y Fischer, R. L. (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 942-947.
- Müller-Xing, R.; Xing, Q.; y Goodrich, J. (2014) Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Front. Plant Sci.* 5: 474.
- Murphy, T. M. (1983) Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* 58: 381-388.
- Nakaya, M.; Tsukaya, H.; Murakami, N.; y Kato, M. (2002) Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43: 239-

- Nelissen, H.; Clarke, J. H.; De Block, M.; De Block, S.; Vanderhaeghen, R.; Zielinski, R. E.; Dyer, T.; Lust, S.; Inzé, D.; y Van Lijsebettens, M. (2003) DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. *Plant Cell* 15: 639-654.
- Nelissen, H.; Eeckhout, D.; Demuynck, K.; Persiau, G.; Walton, A.; van Bel, M.; Vervoort, M.; Candaele, J.; De Block, J.; Aesaert, S.; Van Lijsebettens, M.; Goormachtig, S.; Vandepoele, K.; Van Leene, J.; Muszynski, M.; Gevaert, K.; Inzé, D.; y De Jaeger, G. (2015) Dynamic Changes in ANGUSTIFOLIA3 Complex Composition Reveal a Growth Regulatory Mechanism in the Maize Leaf. *Plant Cell* tpc.15.00269.
- Nelissen, H.; Fleury, D.; Bruno, L.; Robles, P.; De Veylder, L.; Traas, J.; Micol, J. L.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; y Van Lijsebettens, M. (2005) The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 7754-7759.
- Nelissen, H.; De Groeve, S.; Fleury, D.; Neyt, P.; Bruno, L.; Bitonti, M. B.; Vandenbussche, F.; Van der Straeten, D.; Yamaguchi, T.; Tsukaya, H.; Witters, E.; De Jaeger, G.; Houben, A.; y Van Lijsebettens, M. (2010) Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 1678-1683.
- Nelissen, H.; Rymen, B.; Jikumaru, Y.; Demuynck, K.; Van Lijsebettens, M.; Kamiya, Y.; Inzé, D.; y Beemster, G. T. S. (2012) A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr. Biol.* 22: 1183-1187.
- Nemchenko, A.; Kunze, S.; Feussner, I.; y Kolomiets, M. (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J. Exp. Bot.* 57: 3767-3779.
- Ng, L. M.; Melcher, K.; Teh, B. T.; y Xu, H. E. (2014) Absciscic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacol. Sin.* 35: 567-584.
- Nishiyama, R.; Watanabe, Y.; Fujita, Y.; Le, D. T.; Kojima, M.; Werner, T.; Vankova, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Kakimoto, T.; Sakakibara, H.; Schmölling, T.; y Tran, L.-S. P. (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic Acid responses, and abscisic Acid biosynthesis. *Plant Cell* 23: 2169-2183.

- Omidbakhshfard, M. A.; Proost, S.; Fujikura, U.; y Mueller-Roeber, B. (2015) Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Mol. Plant* 8: 998-1010.
- Oracz, K. y Karpiński, S. (2016) Phytohormones Signaling Pathways and ROS Involvement in Seed Germination. *Front. Plant Sci.* 7: 1-6.
- Osley, M. A.; Tsukuda, T.; y Nickoloff, J. A. (2007) ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 618: 65-80.
- Otero, G.; Fellows, J.; Yang, L.; De Bizemont, T.; Dirac, A. M. G.; Gustafsson, C. M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; y Svejstrup, J. Q. (1999) Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol. Cell* 3: 109-118.
- Pan, W. S.; Zheng, L. P.; Tian, H.; Li, W. Y.; y Wang, J. W. (2014) Transcriptome responses involved in artemisinin production in *Artemisia annua* L. under UV-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 140: 292-300.
- Pandey, R.; Müller, A.; Napoli, C. A.; Selinger, D. A.; Pikaard, C. S.; Richards, E. J.; Bender, J.; Mount, D. W.; y Jorgensen, R. A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30: 5036-5055.
- Parihar, P.; Singh, S.; Singh, R.; Singh, V. P.; y Prasad, S. M. (2015) Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153: 334-343.
- Park, H. J.; Kim, W.-Y.; Pardo, J. M.; y Yun, D.-J. (2016) Molecular Interactions Between Flowering Time and Abiotic Stress Pathways Elsevier Inc.
- Piazza, P.; Jasinski, S.; y Tsiantis, M. (2005) Evolution of leaf developmental mechanisms. *New Phytol.* 167: 693-710.
- Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-33.
- Potters, G.; Pasternak, T. P.; Guisez, Y.; y Jansen, M. A. K. (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: Integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell Environ.* 32: 158-169.
- Potters, G.; Pasternak, T. P.; Guisez, Y.; Palme, K. J.; y Jansen, M. A. K. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12: 98-105.
- Radziejwoski, A.; Vlieghe, K.; Lammens, T.; Berckmans, B.; Maes, S.; Jansen, M. A. K.; Knappe, C.; Albert, A.; Seidlitz, H. K.; Bahnweg, G.; Inze, D.; y De Veylder,

- L. (2011) Atypical E2F activity coordinates PHR1 photolyase gene transcription with endoreduplication onset. *Embo J.* 30: 355-363.
- Randriamanana, T. R.; Lavola, A.; y Julkunen-Tiitto, R. (2014) Interactive effects of supplemental UV-B and temperature in European aspen seedlings: Implications for growth, leaf traits, phenolic defense and associated organisms. *Plant Physiol. Biochem.* 93: 84-93.
- Rastogi, R. P.; Richa; Kumar, A.; Tyagi, M. B.; y Sinha, R. P. (2010) Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J. Nucleic Acids* 2010: 1-32.
- Reddy, K. R.; Singh, S. K.; Koti, S.; Kakani, V. G.; Zhao, D.; Gao, W.; y Reddy, V. R. (2013) Quantifying the effects of corn growth and physiological responses to ultraviolet-B radiation for modeling. *Agron. J.* 105: 1367-1377.
- Reiss, B.; Klemm, M.; Kosak, H.; y Schell, J. (1996) RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 3094-3098.
- Rivas-San Vicente, M. y Plasencia, J. (2011) Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62: 3321-3338.
- Rizzini, L.; Favory, J.-J.; Cloix, C.; Faggionato, D.; O'Hara, A.; Kaiserli, E.; Baumeister, R.; Schäfer, E.; Nagy, F.; Jenkins, G. I.; y Ulm, R. (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* (80-.). 332: 103-106.
- Rodriguez, R. E.; Mecchia, M. a; Debernardi, J. M.; Schommer, C.; Weigel, D.; y Palatnik, J. F. (2010) Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development* 137: 103-112.
- Rosa, S. y Shaw, P. (2013) Insights into chromatin structure and dynamics in plants. *Biology (Basel)*. 2: 1378-410.
- Rousseaux, M. C.; Flint, S. D.; Searles, P. S.; y Caldwell, M. M. (2004) Plant responses to current solar ultraviolet-B radiation and to supplemented solar ultraviolet-B radiation simulating ozone depletion: an experimental comparison. *Photochem. Photobiol.* 80: 224-30.
- Rymen, B.; Coppens, F.; Dhondt, S.; Fiorani, F.; y Beemster, G. T. S. (2010) Kinematic Analysis of Cell Division and Expansion. *Methods Mol. Biol.* 655: 65-75.
- Rymen, B.; Fiorani, F.; Kartal, F.; Vandepoele, K.; Inze, D.; y Beemster, G. T. S. (2007) Cold Nights Impair Leaf Growth and Cell Cycle Progression in Maize through Transcriptional Changes of Cell Cycle Genes\n10.1104/pp.106.093948. *Plant Physiol.* 143: 1429-1438.

- Sah, S. K.; Reddy, K. R.; y Li, J. (2016) Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. 7: 1-26.
- Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L. A.; Unsal-Kaçmaz, K.; Linn, S.; Ünsal-Kaçmaz, K.; y Linn, S. (2004) MOLECULAR MECHANISMS OF MAMMALIAN DNA REPAIR AND THE DNA DAMAGE CHECKPOINTS. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39-85.
- Sasek, V.; Janda, M.; Delage, E.; Puyaubert, J.; Guivarc'h, A.; Lopez Maseda, E.; Dobrev, P. I.; Caius, J.; Boka, K.; Valentova, O.; Burketova, L.; Zachowski, A.; y Ruelland, E. (2014) Constitutive salicylic acid accumulation in pi4klIlb1b2 Arabidopsis plants stunts rosette but not root growth. *New Phytol.* 203: 805-816.
- Schaller, G. (2012) Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biol.* 10: 9.
- Schmülling, T.; Werner, T.; Riefler, M.; Krupková, E.; y Bartrina Y Manns, I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *J. Plant Res.* 116: 241-252.
- Schruff, M. C.; Spielman, M.; Tiwari, S.; Adams, S.; Fenby, N.; y Scott, R. J. (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133: 251-61.
- Sebastiaan Winkler, G.; Petrakis, T. G.; Ethelberg, S.; Tokunaga, M.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; y Svejstrup, J. Q. (2001) RNA Polymerase II Elongator Holoenzyme Is Composed of Two Discrete Subcomplexes. *J. Biol. Chem.* 276: 32743-32749.
- Servet, C.; Conde e Silva, N.; y Zhou, D. X. (2010) Histone acetyltransferase AtGCN5/HAG1 is a versatile regulator of developmental and inducible gene expression in Arabidopsis. *Mol Plant* 3: 670-677.
- Shaked, H.; Avivi-Ragolsky, N.; y Levy, A. A. (2006) Involvement of the arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling gene family in DNA damage response and recombination. *Genetics* 173: 985-994.
- Shakeel, S. N.; Wang, X.; Binder, B. M.; y Schaller, G. E. (2013) Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants* 5: 1-16.
- Sharp, R. E.; Poroyko, V.; Hejlek, L. G.; Spollen, W. G.; Springer, G. K.; Bohnert, H. J.; y Nguyen, H. T. (2004) Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55: 2343-2351.
- Shen, Y.; Wei, W.; y Zhou, D. X. (2015) Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends Plant Sci.* 20: 614-621.
- Shimizu-Sato, S. y Mori, H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* 127: 1405-1413.

- Simpson, G. G. y Dean, C. (2002) the Rosetta Stone of Arabidopsis. *Science* (80-.). 296: 285-289.
- Šmehilová, M.; Galuszka, P.; Bilyeu, K. D.; Jaworek, P.; Kowalska, M.; Šebela, M.; Sedláková, M.; English, J. T.; y Frébort, I. (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *J. Exp. Bot.* 60: 2701-2712.
- Song, J. T. (2006) Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in Arabidopsis thaliana. *Mol Cells* 22: 233-238.
- Sridha, S. y Wu, K. (2006) Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant J.* 46: 124-133.
- Sridhar, V. V.; Kapoor, A.; Zhang, K.; Zhu, J. J.-K.; Zhou, T.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. a; y Zhu, J. J.-K. (2007) Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature* 447: 735-738.
- Srivastava, G.; Kumar, S.; Dubey, G.; Mishra, V.; y Prasad, S. M. (2012) Nickel and ultraviolet-B stresses induce differential growth and photosynthetic responses in Pisum sativum L. Seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 149: 86-96.
- Staswick, P. E.; Su, W.; y Howell, S. H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 6837-6840.
- Sterner, D. E. y Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 435-459.
- Street, I. H.; Aman, S.; Zubo, Y.; Ramzan, A.; Wang, X.; Shakeel, S. N.; Kieber, J. J.; y Schaller, G. E. (2015) Ethylene Inhibits Cell Proliferation of the Arabidopsis Root Meristem. *Plant Physiol.* 169: 338-350.
- Takatsuka, H. y Umeda, M. (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J. Exp. Bot.* 65: 2633-2643.
- Takshak, S. y Agrawal, S. B. (2014) Effect of ultraviolet-B radiation on biomass production, lipid peroxidation, reactive oxygen species, and antioxidants in Withania somnifera. *Biol. Plant.* 58: 328-334.
- Takshak, S. y Agrawal, S. B. (2014) Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B radiation in Withania somnifera Dunal, an indigenous medicinal plant. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 140: 332-343.
- Thomashow, M. F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.

- Tilbrook, K.; Arongaus, A. B.; Binkert, M.; Heijde, M.; Yin, R.; y Ulm, R. (2013) The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *Arabidopsis Book* 11: e0164.
- Tran, H. T.; Nimick, M.; Uhrig, R. G.; Templeton, G.; Morrice, N.; Gourlay, R.; Delong, A.; y Moorhead, G. B. G. (2012) Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an α -tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.* 71: 263-272.
- Tsankova, N. y Nestler, E. J. (2010) Epigenetic Regulation in plants. VIII: 435-448.
- Tsukaya, H. (2006) Mechanism of Leaf-Shape Determination. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 477-496.
- Tuteja, N.; Singh, M. B.; Misra, M. K.; Bhalla, P. L.; y Tuteja, R. (2001) Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36: 337-397.
- Ubeda-Tomás, S.; Beemster, G. T. S.; y Bennett, M. J. (2012) Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 17: 326-331.
- Ueda, J. y Kato, J. (1980) Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* 66: 246-249.
- Vandepoele, K.; Vlieghe, K.; Florquin, K.; Hennig, L.; Beemster, G. T. S.; Grissem, W.; Van de Peer, Y.; Inzé, D.; De Veylder, L.; Inze, D.; y De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* 139: 316-328.
- Vanstraelen, M. y Benková, E. (2012) Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 28: 463-87.
- Vercruyssen, L.; Gonzalez, N.; Werner, T.; Schmulling, T.; y Inze, D. (2011) Combining Enhanced Root and Shoot Growth Reveals Cross Talk between Pathways That Control Plant Organ Size in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 1339-1352.
- Vercruyssen, L.; Tognetti, V. B.; Gonzalez, N.; Van Dingenen, J.; De Milde, L.; Bielach, A.; De Rycke, R.; Van Breusegem, F.; y Inzé, D. (2015) GROWTH REGULATING FACTOR5 stimulates Arabidopsis chloroplast division, photosynthesis, and leaf longevity. *Plant Physiol.* 167: 817-32.
- Versées, W.; De Groeve, S.; y Van Lijsebettens, M. (2010) Elongator, a conserved multitasking complex? *Mol. Microbiol.* 76: 1065-1069.
- Vlieghe, K.; Beemster, G. T. S.; Maes, S.; Magyar, Z.; Atanassova, A.; Engler, J. D.

- A.; Groodt, R. De; Veylder, L. De; B-, G.; y H-, S. (2005) The DP-E2F-like Gene DEL1 Controls the Endocycle in *Arabidopsis thaliana*. 15: 59-63.
- Wang, H.; Hao, J.; Chen, X.; Hao, Z.; Wang, X.; Lou, Y.; Peng, Y.; y Guo, Z. (2007) Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Mol. Biol.* 65: 799-815.
- Wang, Z.-Y.; Bai, M.-Y.; Oh, E.; y Zhu, J.-Y. (2011) Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 46: 701-724.
- Wassarman, D. a y Sauer, F. (2001) TAF II 250 : a transcription toolbox Interaction partners. *J. Cell Sci.* 1: 2895-2920.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2013) Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Ann. Bot.* 111: 1021-1058.
- Waterworth, W. M. (2002) Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J. Exp. Bot.* 53: 1005-1015.
- Waterworth, W. M.; Drury, G. E.; Blundell-Hunter, G.; y West, C. E. (2015) *Arabidopsis* TAF1 is an MRE11-interacting protein required for resistance to genotoxic stress and viability of the male gametophyte. *Plant J.* 84: 545-557.
- Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Onckelen, H. Van; y Schmuelling, T. (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- Wijewardana, C.; Henry, W. B.; Gao, W.; y Reddy, K. R. (2016) Interactive effects on CO₂, drought, and ultraviolet-B radiation on maize growth and development. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 160: 198-209.
- Wilkinson, S. y Davies, W. J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell Environ.* 33: 510-525.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 218-223.
- Xu, D.; Huang, W.; Li, Y.; Wang, H.; Huang, H.; y Cui, X. (2012) Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 792-808.
- Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-251.
- Yu, Y.; Bu, Z.; Shen, W. H.; y Dong, A. (2009) An update on histone lysine methylation in plants. *Prog. Nat. Sci.* 19: 407-413.

- Yuan, S. y Lin, H.-H. (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Z. Naturforsch. C.* 63: 313-320.
- Zhang, H.; Han, W.; De Smet, I.; Talboys, P.; Loya, R.; Hassan, A.; Rong, H.; Jürgens, G.; Paul Knox, J.; y Wang, M. H. (2010) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J.* 64: 764-774.
- Zhang, K.; Sridhar, V. V.; Zhu, J.; Kapoor, A.; y Zhu, J. K. (2007) Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 2.:
- Zhou, C.; Zhang, L.; Duan, J.; Miki, B.; y Wu, K. (2005) HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signalling of pathogen response in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 1196-1204.
- Zhou, X.; Hua, D.; Chen, Z.; Zhou, Z.; y Gong, Z. (2009) Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 60: 79-90.
- Zinser, C.; Seidlitz, H. K.; Welzl, G.; Sandermann, H.; Heller, W.; Ernst, D.; y Rau, W. (2007) Transcriptional profiling of summer wheat, grown under different realistic UV-B irradiation regimes. *J. Plant Physiol.* 164: 913-922.